

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie moléculaire

Faculté des sciences

Professeur P.-F. Spahr

ETUDE DE L'ARN SYNTHETASE DU BACTERIOPHAGE R-17 ET DE QUELQUES RELATIONS ENTRE LE VIRUS ET SON HOTE

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

CLAUDE-G. DUCRET

de Plan-les-Ouates (Genève)

THESE No 1602

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0006

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie moléculaire

Faculté des sciences

Professeur P.-F. Spahr

ETUDE DE L'ARN SYNTHETASE DU BACTERIOPHAGE R-17 ET DE QUELQUES RELATIONS ENTRE LE VIRUS ET SON HOTE

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

CLAUDE-G. DUCRET

de Plan-les-Ouates (Genève)

THESE No 1602

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1973

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur Pierre-François SPAHR, directeur de thèse, et du professeur Marc VAN MONTAGU (Université de Gand/Belgique), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 7 novembre 1972

Le Doyen :

Jean MULLER

Thèse 1602



REMERCIEMENTS

Les recherches présentées dans cette thèse ont été effectuées sous la direction du Professeur Pierre-François Spahr auquel je tiens à exprimer ma reconnaissance; ses encouragements et son expérience m'ont été du plus grand profit durant les cinq années passées au sein de son groupe de recherche.

J'aimerais également remercier tous les chercheurs qui, au cours de leurs séjours dans le Département de Biologie Moléculaire, m'ont permis de bénéficier de leur expérience. Parmi eux, j'aimerais plus particulièrement citer Jerry Adams, Richard Burgess, Giovanni Cassani, Suzan Cory, Gary Gussin, Benjamin D. Hall, Philippe Kourilsky et Jean - Michel Louarn.

Pour terminer, je souhaiterais rendre hommage au soutien constant fourni par mon épouse dont la patience et la bonne humeur furent parfois soumises à de rudes épreuves.

© 2016 Pearson Education, Inc. or its affiliate(s). All rights reserved. Printed in the United States of America. This publication is protected by copyright. Permission is granted to reproduce copies of this book for personal or internal reference use only. No other reproduction, distribution, or sale is permitted without written permission from Pearson Education, Inc.

b) effet de la température et des concentrations en K^+ et en Mg^{++} 23

c) effet de la concentration en nucléosides tri-phosphates	24
d) effets de traitements préalables de l'extrait brut sur l'activité enzymatique	25
1) autodégradation	
2) chromatographie sur Séphadex G-50	
e) effet de l'addition de divers ARN sur l'activité enzymatique	25
1) analyse des produits de synthèse <u>in vitro</u>	
2) effet de l'addition de divers ARN	
f) effet de l'addition de polynucléotides synthétiques sur l'activité de la synthétase	27
g) effet de l'addition d'extraits bruts sur l'activité de la synthétase	29
<u>Chapitre 3</u> : essais de purification de la synthétase enzymatique	41
a) Introduction	41
b) précipitations au sulfate d'ammonium	41
c) fractionnement au sulfate de protamine	44
d) fractionnement par ultracentrifugation dans des gradients de glycérol ou de saccharose	44
e) autres tentatives	45
f) conclusions	48
<u>Chapitre 4</u> : études de quelques propriétés de la synthétase cistronique synthétisée <u>in vitro</u> et <u>in vivo</u>	49
a) Introduction	49
b) synthèse <u>in vitro</u> de synthétase cistronique	51
c) synthèse <u>in vivo</u> de synthétase cistronique	52
d) détermination du poids moléculaire de la synthétase cistronique	54
<u>Discussion</u>	56
Deuxième partie : études de quelques relations entre R17 et la bactérie-hôte	68-104
<u>Introduction</u>	69
<u>Chapitre 1</u> : relations entre la répllication du phage, l'ARN polymérase bactérienne et le chromosome cellulaire	70
a) relation entre phage et activité ARN polymérase	70
b) relations entre R17 et le chromosome bactérien	73
c) discussion et conclusion	75

<u>Chapitre 2 : la simulation lysogénique</u>	82
a) Introduction	82
b) les épisomes "clairs" et "troubles"	84
c) isolement et propriétés de clones montrant la simulation lysogénique	85
d) la simulation lysogénique est-elle due à une transmission interne ou externe de phages ?	90
e) analyse de la simulation lysogénique au niveau épisomique	95
a) analyse des cellules lac^-	
b) analyse des cellules $\text{lac}^+\text{R17}^S$ et $\text{lac}^+/\text{R17}$	
f) discussion sur le mécanisme de la simulation lysogénique et conclusion	100

Références bibliographiques

105-114

INTRODUCTION

En 1960 Loeb isola, à partir d'eaux résiduelles, un bactériophage nommé f2 (142) dont le génôme s'avéra ultérieurement être constitué, non pas d'ADN, mais d'ARN (143). On découvrit ultérieurement bien d'autres phages à ARN. De nombreux travaux permirent l'accumulation d'une somme considérable d'informations concernant, d'une part, le mode de répllication de ces virus et, d'autre part, grâce à l'emploi systématique de leur génôme comme ARN messenger, le mécanisme de la biosynthèse des protéines.

Sur des bases sérologiques (194), chimiques (166, 187) et physiques (167), les phages à ARN sont répartis en trois groupes : le Groupe I comprend le phage R17 (176), utilisé dans les travaux de cette thèse, ainsi que les phages f2 (142), MS2 (41), M12 (94), fr (150) et quelques autres. Le Groupe II est formé principalement des phages GA et SD (166) alors que le Groupe III comprend le phage Q β (172), dont il sera abondamment question, et quelques autres phages qui lui sont très étroitement apparentés.

Les bactériophages à ARN, comme les virus filamenteux à ADN du type fl et fd (150, 253, 151), infectent spécifiquement les cellules mâles (129) dont ils utilisent les pilis sexuels (158, 98), à divers sites d'adsorption (29, 102), comme véhicule de pénétration (37, 177, 103, 39, 40). Comme les autres phages à ARN, R17 est sphérique (70, 58, 229) et montre une structure icosahédrique (37). Son poids particulaire est de 3.6×10^6 daltons (216, 70). La particule virale est constituée d'une molécule d'ARN phagique, dont le poids moléculaire est de 1.1×10^6 daltons (70, 216, 159, 204), emballée dans une coque formée de 180 molécules (57) de protéine capsidiale (237, 238, 131, 52) et d'une molécule de protéine d'assemblage (5, 171). Il est possible de reconstituer des particules infectieuses à partir de ces trois éléments purifiés (185, 153, 152).

Des études génétiques ont montré que l'ARN viral est constitué de trois cistrons adjacents nommés A, B et C (78) qui dirigent la synthèse de trois protéines (79, 163, 230, 222) : le cistron A code pour la protéine d'assemblage, le cistron B pour la protéine capsidiale alors que le produit du cistron C, nommé "ARN synthétase" ou "réplicase", participe à la formation d'une enzyme responsable de la répllication de l'ARN viral (voir plus loin). Des travaux de séquences (135, 106) et de scission spécifique de l'ARN (209) ont montré que les trois cistrons sont disposés dans l'ordre : extrémité 5', cistron A (protéine

d'assemblage), cistron B (protéine capsidiale), cistron C (synthétase), extrémité 3'OH. L'ARN possède, en plus des séquences de ponctuation qui séparent les cistrons, des séquences qui ne sont pas traduites par les ribosomes (36).

L'ARN synthétase ou répliquase est une enzyme qui catalyse la réplication de l'ARN viral. Chez Q β , elle est composée de quatre sous-unités différentes (110) nommées, par ordre de grandeur moléculaire, α , β , γ et δ (122); la sous-unité β est le produit du cistron C de l'ARN phagique (110, 122); α est le facteur d'interférence "i" (112, 77, 76) alors que γ et δ sont les facteurs Tu et Ts (178). La répliquase de Q β catalyse in vitro la réplication de l'ARN phagique en opérant de l'extrémité 3'OH de la matrice à l'extrémité 5' terminale (14). Elle ne peut toutefois catalyser cette réplication en utilisant comme matrice un ARN extrait de phages isolés (ARN de brin "+") qu'en présence de deux facteurs fournis par la cellule-hôte (11, 62, 61, 197); le nouveau brin synthétisé (brin "-"), de séquence complémentaire à l'ARN de brin "+" (53, 54, 47), peut à son tour servir de matrice à la répliquase, mais sans que la présence des facteurs ne soit requise. On ignore pourquoi, dans le cas de Q β , ces facteurs sont nécessaires et si les répliquases des autres bactériophages à ARN en requièrent également.

Le cycle de réplication de R17 peut être résumé comme suit : après que les phages se soient adsorbés sur les pilis sexuels, l'ARN viral est injecté activement (200, 201), avec la protéine d'assemblage (124, 126), à l'intérieur de la cellule-hôte où il est traduit en protéines par les ribosomes. Parmi elles (230, 164), il y a la synthétase qui réplique l'ARN phagique. Six minutes après l'infection, on constate l'apparition de molécules d'ARN de brin "-" (193, 181) qui forment avec de l'ARN de brin "+" des formes répliquatives (59, 60, 75). C'est sur des formes répliquatives que la synthétase polymérise de façon répétitive de nouvelles molécules d'ARN viral de brin "+" (173). Ces dernières servent à leur tour d'ARN messager pour la synthèse de nouvelles protéines virales. Les phages (74) se forment en enveloppant des molécules d'ARN "+" d'une coque de protéine capsidiale et d'une molécule de protéine d'assemblage (188, 109). Environ une à deux heures après l'infection, les bactéries, bourrées de phages, éclatent en libérant chacune dans le milieu de culture en moyenne 1'000 à 40'000 phages (216) qui pourront alors infecter autant de nouvelles cellules.

Il est possible de suivre la synthèse in vivo des protéines virales au cours du temps en incorporant des acides aminés radioactifs dans des cellules infectées et traitées avec un antibiotique inhibant la synthèse d'ARN cellulaire puis en analysant les protéines marquées par électrophorèse en gels de polyacrylamide. En utilisant cette technique Vinuela et coll. (230) d'une part et Nathans et coll. (164) de l'autre, ont montré que la traduction des trois protéines virales de MS2 ne commence pas simultanément : en effet la synthèse du produit du cistron C est forte en début d'infection pour tomber presque à zéro après trente minutes; celle de la protéine d'assemblage (cistron A)

débute plus tardivement et atteint un maximum environ une demie heure après l'infection alors que la synthèse de la protéine capsidiale, relativement faible durant les vingt premières minutes de l'infection, se maintient à un taux élevé jusqu'à la lyse cellulaire; c'est ainsi que cinquante minutes après l'infection, il n'y a pratiquement plus que de la protéine capsidiale qui soit synthétisée.

Par ailleurs le génôme des phages à ARN est, dans les systèmes in vitro de synthèse des protéines, un excellent ARN messenger; c'est par exemple en utilisant l'ARN de f2 que Nathans et coll. (162) ont démontré pour la première fois, c'était en 1962, la synthèse in vitro d'une protéine complète. Les études de la traduction in vitro des ARN phagiques indiquent que, dans ces conditions également, la synthèse des protéines virales n'est pas uniforme.

Ces différences, constatées tant in vivo qu'in vitro, montrent que la traduction de l'ARN viral est soumise à plusieurs mécanismes de contrôle qui peuvent être classifiés comme suit :

a) contrôle de la synthèse de la synthétase

Divers travaux in vivo (164, 221, 230, 231) ont montré que la synthèse de la synthétase est sous le contrôle de la protéine capsidiale. In vitro on a remarqué que la présence de protéine capsidiale réprime la traduction du cistron C (135, 219, 232, 233, 220, 45). Elle se lie en effet très spécifiquement (79, 218, 44, 186, 234, 95, 210, 223) au site d'initiation de la synthétase (17), empêchant ainsi toute traduction de ce cistron à partir du moment où une quantité suffisante de protéine capsidiale aura été accumulée. Cette répression favorise donc la production de protéine capsidiale dont il faut de grandes quantités pour former les particules virales.

b) contrôle exercé par la conformation tri-dimensionnelle de l'ARN

Au début d'une synthèse in vitro de protéines, un seul ribosome (224) se lie à l'ARN au site d'initiation de la protéine capsidiale (135, 134, 99, 6). Si une mutation amber proximale (en position 6 par exemple) empêche la progression du ribosome au long du cistron B, on constate que le cistron suivant, celui de la synthétase, n'est pas traduit (26, 28). Cet effet, nommé polarité et dont il sera question plus loin, est dû à la configuration tri-dimensionnelle de l'ARN qui est graduellement déployé par les ribosomes (133, 51). Une série d'expériences in vitro, tendant à modifier la structure tri-dimensionnelle de l'ARN, confirment cette hypothèse (136, 138, 71, 66, 51). L'effet de polarité se retrouve in vivo (24, 8).

La synthèse de la protéine d'assemblage, par ailleurs, est soumise à un contrôle apparenté : il semble, d'après des expériences accomplies in vitro avec l'ARN de Q β , que le site d'initiation du cistron A se replie sur l'ARN et empêche ainsi toute synthèse de protéine d'as-

semblage ailleurs que sur une chaîne naissante d'ARN (138, 120, 121, 240). Un mécanisme analogue a été décrit chez f2 (141).

c) contrôle exercé par la synthétase

Comme nous l'avons vu plus haut, le même brin d'ARN peut remplir successivement les fonctions messagère et matricielle; c'est particulièrement évident dans le cas de l'ARN parental qui d'abord sert d'ARN messager pour la synthèse de la synthétase puis de matrice à l'activité répliquative de cette enzyme (246). Il fut montré (120, 121, 240) que la répliqueuse de Q β agit in vitro en répresseur de la synthèse des protéines : elle se fixe à proximité du site d'initiation de la protéine capsidiale et bloque ainsi toute initiation par de nouveaux ribosomes. Lorsque ces derniers ont terminé leur synthèse, une autre molécule de répliqueuse peut commencer à répliquer l'ARN à partir de la position 3'OH.

d) contrôle exercé par l'hôte

La cellule-hôte assure divers "services" nécessaires à la répllication des phages comme la synthèse des protéines et la fourniture de nucléosides triphosphates pour la synthèse de l'ARN; il faut donc s'attendre à ce que l'altération de ces fonctions, comme la carence en un acide aminé indispensable (63) ou en uracile (108), bloque la répllication des phages. Mais la bactérie exerce d'autres contrôles : on a remarqué par exemple que, dans les systèmes in vitro de synthèse des protéines, le taux d'initiation au début du cistron A diffère, à la même température, suivant la souche cellulaire dont proviennent les sous-unités ribosomales utilisées dans le système (139, 140). La cellule fournit, par ailleurs, des facteurs qui, in vitro et pour ce qui concerne la répliqueuse de Q β , jouent un rôle primordial dans la synthèse des formes répliquatives (voir ci-dessus) (11, 61, 197, 62). Elle contribue aussi très probablement à l'assemblage (178) ou au relâchement des particules phagiques dans le milieu (48, 49).

Nous verrons dans le premier chapitre de la deuxième partie de cette thèse que les relations entre le phage et la bactérie-hôte peuvent, dans certains cas, s'avérer nettement plus complexes.

Plusieurs excellentes revues sur le cycle répliquatif des phages à ARN ont été publiées (125, 55, 130, 215, 228, 245, 254 et 151). Notre revue de la littérature pour cette thèse a cessé à fin août 1972.

OBJECTIFS DES RECHERCHES PRESENTÉES DANS CETTE THÈSE

Au moment où cette thèse débuta (printemps 1969), l'ARN synthétase de R17 n'avait pas été isolée. Sa purification en tant qu'enzyme active était nécessaire pour aborder certaines études parmi lesquelles on peut citer

a) la caractérisation de son activité et l'étude de l'aspect enzymatique de la réplication de R17;

b) son utilisation dans des travaux de séquences de l'ARN comme cela se pratique avec l'enzyme du phage voisin Q β (19);

et

c) sa caractérisation en tant que protéine : en effet, ne connaissant pas encore à l'époque la composition structurale de l'enzyme active on pensait qu'elle ne pouvait être formée que d'un seul polypeptide codé par le phage; la détermination de certains paramètres de cette protéine (poids moléculaire, composition en acides aminés terminaux) étaient nécessaires lors de travaux de séquences poursuivis dans notre laboratoire pour déterminer l'importance des régions non traduites à l'extrémité 3'OH de l'ARN et ainsi détecter indirectement, parmi les séquences de nucléotides, le signal de ponctuation indiquant la terminaison de la traduction de la synthétase.

Nos tentatives de purifier l'enzyme active se heurtèrent à d'énormes difficultés dues principalement à l'instabilité de son activité dès qu'elle n'est plus dans les conditions d'extrait brut. On essaya dès lors d'isoler le polypeptide codé par le cistron C de l'ARN sans plus tenir compte de ses propriétés enzymatiques. Ce ne fut pas non plus tâche facile.

Toutefois, au cours de nos travaux, l'action inattendue de certains antibiotiques affectant théoriquement seulement la cellule-hôte, nous amena à examiner quelques relations entre la cellule-hôte et le phage infectant. Cette étude nous fit découvrir entre le phage et une population de cellules un état de relation équilibrée auquel nous avons donné le nom de "simulation lysogénique".

Les résultats de cette thèse sont présentés en deux parties :

- la première concerne les tentatives de purification de la synthétase
- la deuxième l'étude de quelques relations entre la réplication du phage et sa cellule-hôte.

MATERIEL ET METHODES

=====

A) MATERIEL

Les produits usuels ont été achetés soit chez Fluka A.G. Buchs (Suisse) soit chez Merck A.G., Darmstadt (Allemagne).

1.- Bactéries

(la provenance est indiquée entre parenthèses)

Les souches suivantes ont été utilisées :

S26	su ⁻ , (λ), Hfr ou F ⁺ (R. Burgess)
S26RIE	amsu ⁺ , (λ), Hfr ou F ⁺ (G. Gussin)
C600GF ⁺ /λ	thr ⁻ , leu ⁻ , B ₁ ⁻ , lac ⁻ , Sm ^S , amsu ⁺ _I , F ⁺ (G. Gussin)
112-12	ocsu ⁺ ₇ , F ⁺ ou Hfr (R. Herzog)
CA165	i ⁻ lac ₂ , ocsu ⁺ _B , (λ), Hfr (A. Bolle)
D10	met ⁻ , RNase I, (λ), Hfr (R. Gesteland)
Q13	met ⁺ , RNase I ⁻ , PNPase ⁻ , (λ), F ⁺ (S. Cory) (cette souche s'est avérée en outre tyr ⁻)
K225	his ⁻ , lys ⁻ , arg ⁻ , Hfr (N. Fedoroff)
C3000Hfr	Hfr (stock du laboratoire)
LC149	pro.lac, leu ⁻ , thy ⁻ , λ ⁻ , B ₁ ⁻ , F' lac (L. Caro)
607	ara ⁻ , leu ⁻ , lac ⁻ , proC ⁻ , pur E ⁻ , Try ⁻ , Lys ⁻ , Sm ^R , xyl ⁻ , met ⁻ , λ ⁻ , B ₁ ⁻ , F ⁻ (L. Caro)
AS 19	souche prototrophe décrite par Sekiguchi et coll. (195) (R. Burgess)
K12 F ⁻ (ColE2)	: souche préparée par (S. Python) transduction d'un épisome colicinogénique d'une Salmonella ty- phani
T46	leu ⁻ , thy ⁻ , proβ.lac, cycloserine ^R , DNA ^{ts} _A , F' lac (L. Caro)

2.- Phages

R17 sauvage (P.F. Spahr)
R17amB2, R17amB17, R17amB11 et R17amA7 (G. Gussin)
MS2 sauvage (M. von Montagu)
Q β sauvage (D. Kolakofsky)
fd sauvage (D. Willems)
T $_4$ sauvage (M. Fluck)
T $_7$ sauvage (M. Chamberlain)
 λ vir virulent (P. Kourilsky)

3.- Milieux de culture

- le milieu "R broth" contient par litre d'eau distillée :
bactotryptone (Difco Laboratories, Detroit) 8 gr, NaCl
10 gr, Yeast extract (Difco) 1 gr; après stérilisation
ajouter 1 gr de glucose et 1 mmole de CaCl $_2$ stériles.
- le milieu MTPA est celui décrit par Viñuela et coll. (230)
- le bouillon H contient par litre d'eau distillée : NaCl
5 gr, glucose 1 gr, bactopectone (Difco) 5 gr, nutrient
broth (Difco) 8 gr et 3 ml de NaOH 2 %.
- le milieu M9 contient par litre : Na $_2$ HPO $_4$ ·7H $_2$ O 13,3 gr,
KH $_2$ PO $_4$ 3,0 gr, NaCl 0,5 gr, NH $_4$ Cl 1,0 gr; après stérili-
sation, on ajoute : glucose 50 % 8,0 ml, CaCl $_2$ M 0,2 ml,
MgSO $_4$ 40 % 0,5 ml (soit environ 1mM) et FeCl $_3$ 0,01 M
0,3 ml. Lorsque le milieu est indiqué M9S, on a ajouté
en outre 10 ml de Vitamin free casamino acids (Difco) 20 %.
Si le milieu M9 sert à la préparation de boîtes minimum
(voir Méthodes), il est composé de sels uniquement, auxquels
on a ajouté un sucre déterminé (lactose par exemple) ou du
glucose et un ou plusieurs acides aminés.

4.- Tampons

Le tampon TGE contient : Tris (Sigma)/HCl pH 25 = 7,5 0,02 M,
MgCl $_2$ 0,005 M, β -mercaptoéthanol 0,005 M, EDTA 0,001 M et
glycérol 20 %.

Le tampon TG est identique au TGE sauf qu'il ne contient pas
d'EDTA.

Le TCA-PP contient 5 % de TCA et 0,02 M de Na $_4$ P $_2$ O $_7$ · 10 H $_2$ O
(Riedel de Haën A.G. (Hannovre)).

Le tampon BU contient par litre : 7 gr de Na_2HPO_4 , 4 gr de NaCl et 3 gr de KH_2PO_4 .

Les autres tampons utilisés ont été préparés exactement comme décrit par les auteurs mis en références.

5.- Comptage de la radioactivité

Deux liquides scintillants ont été utilisés :

- a) le liquide scintillant à base de toluène qui contient :
3,6 gr/l de 2,5-diphényloxazol (=PPO) (Merck), 90 mgr/l de 1,4-bis[2-(4 Méthyl - 5 - phényloxazolyl)] - benzène (=POPOP) (Packard Instrument Company, Inc.) et toluène ad 1 litre.
- b) le liquide scintillant de Kinard (118) hydromiscible qui contient :
I : xylol : 5 volumes; Dioxane : 5 volumes
et ethanol : 3 volumes.
II : Naphtalène : 80 gr; PPO (voir ci-dessus) : 5 gr et POPOP (voir ci-dessus) 50 mgr.

Ajouter I à II ad 1 litre.

La radioactivité a été mesurée soit dans un compteur Beckman (modèle LS-250) soit dans un Packard 3320.

6.- Divers

Les acides aminés purifiés, les bases nucléiques, les nucléosides mono et triphosphates et le Cleland's Reagent provenaient de chez Calbiochem. L'alumine a été achetée chez Norton Co-Worcester. Les enzymes provenaient des maisons suivantes : la DNase I de Worthington Biochemical Co; la RNase de Miles-Seravac; le lysozyme de T_4 de Calbiochem et le lysozyme de blanc d'oeuf de Sigma.

L'actinomycine D a été achetée chez Calbiochem; la rifampicine a été généreusement fournie par CIBA - Bâle (Code : CIBA 411 166-Ba) sous forme de sel de sodium; la streptolydigin nous a été donnée par R. Burgess.

La DEAE - cellulose (Diethylaminoethyl cellulose) a été achetée chez Whatman (DE52, Catalogue No 24521); la résine P-300 (Bio-Gel) provenait de chez Bio-Rad Laboratories, le Sephadex G-50 et la DEAE-Sephadex de chez Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala).

L'acrylamide et le bis-acrylamide provenaient de chez Eastman Kodak et le Temed (N,N,N',N',-tétraméthyléthylènediamine) de chez Canaco (Bethesda).

Les polynucléotides synthétiques ont été achetés chez Miles et le sulfate de protamine chez Lilly.

B) METHODES

1.- Préparation d'extraits bruts

Un litre de milieu de culture "R broth" est inoculé avec 10 ml d'une suspension bactérienne de C600 GF⁺/λ (voir chapitre 1 de la première partie) provenant d'une pré-culture laissée toute la nuit à 37°. La densité optique est suivie à 550 mμ tout au cours de la croissance à la chambre chaude sur un agitateur rotatif. Dans ces conditions, les cellules montrent un temps de génération de 27 à 30 minutes. Lorsque la culture a atteint une concentration d'environ 10⁸ cellules par ml -soit une D.O. 550 = 0,4- on lui ajoute un stock de phages R17 dilué dans 150 ml de bouillon du culture de façon à obtenir une multiplicité d'infection d'environ 50 phages par bactérie. Durant les cinq minutes qui suivent l'infection, l'agitation de la culture est très douce puis elle est portée au maximum d'intensité. Vingt minutes après l'infection, un échantillon de 10 ml est transvasé dans un petit erlenmeyer stérile qui sera incubé pendant deux heures afin de tester la bonne qualité de l'infection; quand on utilise la cellule S26RIE au lieu de C600GF⁺/λ, on n'observe pas toujours de lyse visible au spectrophotomètre, bien que l'on obtienne d'excellents titres de phages.

Le reste de la culture est rapidement refroidi à 0°C dans un mélange réfrigérant de glace carbonique et d'acétone en évitant soigneusement la formation d'une croûte de glace à la périphérie du récipient servant à la culture. Les cellules sont ensuite sédimentées dans des bouteilles de Nalgène (rotor GS3, centrifugeuse Sorvall, 10 minutes à 13.000 x g). Le sédiment est collecté à la spatule, déposé sur une feuille de parafilm préalablement tarée, pesé et stocké au congélateur. Il peut être ainsi conservé pendant plusieurs semaines sans qu'il y ait de perte d'activité.

Un poids de cellules infectées et congelées est ajouté, dans un mortier préalablement refroidi à la température de la chambre froide où cette opération s'effectue, à deux poids d'alumine. Le mélange est broyé "à sec" au moyen d'un pistil jusqu'à l'obtention d'une pâte moirée que l'on met ensuite en suspension dans un volume de tampon TGE correspondant à cinq fois le poids des cellules broyées. La suspension est ensuite centrifugée 10 minutes à 3.000 g pour éliminer l'alumine et les cellules non broyées; le surnageant sera centrifugé une seconde fois 10' mais à 30.000 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de cette deuxième centrifugation forme ce que l'on appellera l'extrait brut. L'activité enzymatique qu'il contient est stable pendant plusieurs jours si l'extrait est conservé à au moins -20°C.

D'autres méthodes de préparation d'extraits bruts ont été testées : la lyse au lysozyme et le broyage aux billes de verre donnent des extraits bruts jouissant des mêmes propriétés que l'extrait brut préparé au moyen d'alumine. Cette dernière méthode a été toutefois conservée parce qu'elle fournit des résultats plus reproductibles que les deux autres.

2.- Méthode de dosage

La méthode décrite par August et Eoyang (9) a largement servi de point de départ. L'activité enzymatique que l'on désire mettre en évidence est la polymérisation de ribonucléosides triphosphates sur une matrice d'ARN. Comme de grandes quantités d'ARN polymérase (25) se trouvent dans les extraits bruts, on ajoutera dans le mélange de réaction de la DNase qui, donc, détruira le substrat de l'ARN polymérase ou de la rifampicine qui inhibe cette enzyme (81, 154). On ajoute également au mélange de réaction du phosphoénol pyruvate et de la pyruvate kinase pour éviter la formation de nucléosides 5' diphosphates lors de l'incubation et donc assurer que l'activité mesurée n'est pas le fait de la polynucléotide phosphorylase (73). On a également évité l'emploi de CTP et d'ATP marqués car ils sont utilisés par d'autres enzymes (182, 67).

Le mélange de réaction standard contient dans 250 μ l : 25 μ moles de Tris/HCl pH 7.0, 3 μ moles de $MgCl_2$, 1 μ mole de β -mercapto-éthanol, 1 μ mole de phosphoénol pyruvate, 1 μ gr de phosphokinase, 0,6 μ mole d'ATP, UTP et CTP, 10 μ gr de DNase ou 1 μ gr de rifampicine, 0,1 μ mole de H^3 -GTP ou UTP dont l'activité spécifique, après dilution avec du GTP ou de l'UTP non marqué, est connue ainsi qu'une quantité variable (1 à 50 μ litres) d'extrait brut. Le volume réservé à l'enzyme (100 μ l) et non utilisé par l'échantillon dosé est compensé par du tampon TGE (dans lequel l'extrait brut a été préparé). L'incorporation est effectuée à 37°C durant 20 minutes sauf lorsqu'une autre température ou une autre durée d'incubation sont indiquées. La réaction est arrêtée par la mise dans un bain de glace et l'addition de 3 ml de TCA-PP. Après 15 minutes à la glace, les précipités, qui contiennent les ribonucléosides triphosphates polymérisés, sont filtrés sur millipores (HA, 0,45 μ , 25 mm ϕ) ou sur des filtres de verre GF/C (Whatman), rincés 3 fois avec 5 ml de TCA-PP, une fois avec de l'acétone (pour éliminer le TCA qui produit un assez fort effet de "quenching" en scintillation liquide), séchés et comptés dans 10 ml de liquide scintillant à base de toluène.

3.- Synthèse in vitro de protéines

Nous avons utilisé la méthode décrite par Capecchi (21) pour préparer les extraits S30 (sauf la cellule : D10 au lieu de S26). Ces extraits étaient stockés au moins à -20°C (la plupart du temps à -60°C). L'ARN de R17 a été préparé par P.F. Spahr, selon la méthode décrite (72).

La procédure utilisée de préincubation de l'extrait S30 et de synthèse in vitro des protéines a été décrite par Salzer et coll. (191).

Pour mesurer les CPM précipitables au TCA, on a ajouté, par échantillon prélevé, 1 goutte d'albumine (10 mgr/ml) et 2 ml de TCA 7 %. Après 10 minutes à la glace, l'échantillon était porté pendant 15 minutes à 90°C dans un bain marie, refroidi, filtré sur un filtre de verre GF/C (Whatman), rincé trois fois avec 5 ml de TCA 5 % et une fois avec de l'acétone, séché et compté dans 5 ml de liquide scintillant à base de toluène.

4.- Electrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS

Les gels de polyacrylamide ont été préparés exactement en suivant la méthode décrite par Viñuela et coll. (230). Le "sample buffer" est le tampon indiqué par Viñuela et coll. dont la concentration en glycérol (originellement de 25 %) a été abaissée à 10 %. Le bleu de bromophénol (Eastman) à 0,002 % (1 μ l par gel) servait à indiquer le front de migration de l'électrophorèse.

Pour déterminer la radioactivité à l'intérieur des gels, ces derniers étaient coupés, au moyen d'une trame de fils d'acier, en tranches de 1,2 mm, les tranches séparées étant ensuite traitées comme décrit par Viñuela et coll. (230).

5.- Détermination des concentrations en protéines et en acides nucléiques

Les protéines ont été dosées par la méthode du Biuret (157) ou celle de Lowry et coll. (144). Les acides nucléiques l'ont été en mesurant la D.O. à 260 m μ (1 O.D.₂₆₀ = 43 μ gr/ml) (Spectrophotomètre Zeiss M4 QIII).

6.- Méthodes bactériologiques

Les phages ont été titrés par la méthode de Adams (1), sauf indications contraires sur boîte H, c'est-à-dire dont l'agar contient du bouillon H additionné de 10 gr/l. d'agar (Difco); les incubations se font à 37°C, sauf si une autre température est mentionnée. Si on mentionne des éléments ajoutés (acides aminés purifiés, vitamine, etc...), ils l'ont été par étalement au râteau de verre. Les boîtes minium sont préparées de la même façon à partir de milieu M9. Les boîtes indicatrices Mac Conkey sont préparées à partir de 40 gr/l de "Mac Conkey agar base" (Difco) additionné de 10 gr/l de lactose.

Les "spot-tests" consistent à faire tomber une petite goutte d'une suspension de phages sur un gazon gélifié de bactéries indicatrices puis à incuber la boîte 10 à 15 heures à 37°C sauf indications contraires. On peut aisément faire 5 "spot-tests" sur la même boîte.

7.- Abréviations utilisées

En plus des abréviations très courantes (ADN, ARN, ATP, CPM, etc...) nous avons utilisé : D.O.₅₅₀ (densité optique à 550 m μ), P.M. (poids moléculaire), TCA (acide trichloracétique), TPM (tours par minute), SDS (dodécylsulfate de sodium).

RESULTATS

=====

Première partie

TENTATIVES DE PURIFICATION

DE L'ARN SYNTHETASE DE R17

INTRODUCTION

Au moment où ce travail débuta (printemps 1969), la purification des ARN synthétases des phages f2 et MS2, apparentés sérologiquement à R17 (voir Introduction de la thèse), avait déjà été tentée sans grand succès et avec des résultats contradictoires. C'est ainsi que pour MS2, Haruna et coll. (82, 83) avaient montré que l'activité de l'enzyme purifiée */ est dépendante de l'addition d'ARN matriciel de MS2 et catalyse la synthèse d'ARN pendant plus de cinq heures; Weissmann et coll. (242, 244) par contre avaient montré que l'activité de la même enzyme, purifiée environ 50 fois, est instable et ne manifeste aucune dépendance de l'addition d'ARN viral. Quant à l'ARN synthétase de f2, purifiée environ 150 fois par August et coll. (8), plusieurs ARN autre que l'ARN viral peuvent lui servir de matrice : les ARN ribosomal et de transfert de divers souches de cellules ainsi que celui du virus de la mosaïque du tabac.

Par contre la réplique (ou ARN synthétase) du phage Q β , sérologiquement différent mais par ailleurs très voisin du R17, avait été purifiée par les groupes d'August (96, 13, 10) et de Spiegelman (46, 85, 84). Son activité stable est dépendante de l'addition d'ARN phagique. Elle nous incita à étudier la purification de l'ARN synthétase de R17.

Dans une première étape, décrite au chapitre 1, nous avons mis au point un système bactérie - phage R17, déjà suspecté par Gussin (78), capable de surproduire l'ARN synthétase. Dans le chapitre 2, nous décrivons l'étude de différents paramètres affectant la cinétique et la stabilité de l'ARN synthétase présente dans un extrait brut de cellules infectées; cette étude devait permettre de mettre au point une technique de dosage de cette enzyme. Le chapitre 3 est consacré à différentes tentatives de purification de l'ARN synthétase; elles se sont toutes soldées par un échec dû très probablement à l'instabilité de l'activité enzymatique au cours des manipulations.

A l'époque où nous rencontrions ces difficultés, les travaux de Kamen (110) d'une part et de Kondo et coll. (122) d'autre part sur la réplique de Q β montrèrent que l'enzyme active de ce phage est composée de quatre protéines différentes dont trois sont fournies par la cellule-hôte alors que la quatrième est codée par le cistron C du génome phagique. Nous avons alors essayé d'isoler la sous-unité codée par R17; ces tentatives de purification font l'objet des études décrites dans

*/ ces publications ne présentent aucune table de purification, aucun calcul de rendement ni d'activité spécifique, ce qui rend les comparaisons difficiles.

le chapitre 4.

Afin d'éviter des confusions, nous nommerons par la suite "synthétase cistronique" la protéine codée par le cistron C de l'ARN phagique et "synthétase enzymatique" le complexe enzymatique responsable de la duplication de l'ARN viral.

Chapitre 1

MISE AU POINT D'UN SYSTEME BACTERIE-HOTE - PHAGE R17 SURPRODUISANT

LA SYNTHETASE ENZYMATIQUE

a) Bases théoriques

A la suite des travaux de Gussin et coll. (79), on sait que la synthétase cistronique de R17 n'est synthétisée que si les ribosomes ont préalablement traduit une partie au moins du cistron B codant pour la protéine capsidiale. Nous en avons déjà fait mention dans l'Introduction de cette thèse. Cet effet, appelé polarité, s'explique par le fait que le site d'initiation du cistron C (synthétase) n'est pas directement accessible aux ribosomes à cause de la configuration tri-dimensionnelle de l'ARN; ce dernier est déployé lors du passage des ribosomes le long du cistron B et ne permet l'accès au site d'initiation du cistron C que si une partie importante (au delà de la position 6 en tout cas) du cistron B a été traduite. D'autre part, comme nous l'avons déjà mentionné, la protéine capsidiale, une fois synthétisée en quantités appréciables, est capable de réprimer la synthèse de synthétase cistronique.

Si donc on pouvait construire un système permettant le passage des ribosomes au long du cistron B (donc d'éviter l'effet de polarité) et d'en avoir une traduction quantitativement faible (empêchant ainsi l'effet de répression), on devrait observer une surproduction en synthétase cistronique. Un tel système avait déjà été suggéré par les travaux de Gussin (78).

Nous avons donc employé le mutant R17amB2 (78) dont la mutation amber affecte le sixième acide aminé de la protéine capsidiale et diverses souches amber-suppresseurs (16, 68) qui suppriment avec plus ou moins d'efficacité la mutation amber; on permet ainsi, une fois qu'un ribosome a franchi la mutation (23), de déployer l'ARN et, conséquemment, de démasquer le site d'initiation de la synthétase, tout en ne synthétisant que de faibles quantités de protéine capsidiale.

Gussin (78) a, par ailleurs, montré que l'effet de polarité est approximativement inversement proportionnel à l'efficacité de la suppression (à condition toutefois de ne pas atteindre zéro,

comme c'est le cas dans une souche su^-). Cela nous a incité à utiliser également deux souches ochre-supprimeurs (22) avec le mutant R17amB2 : ce sont 112-12 dont le type de supprimeur ne nous est pas connu et CA165 qui possède le su_B^+ ; cette idée nous a été suggérée par G. Gussin : il semble en effet que les supprimeurs ochres possèdent également la capacité de supprimer, mais avec une moindre efficacité, les mutations amber. Il y avait donc de bonnes raisons d'espérer que ces souches permettraient une forte surproduction de synthétase cistronique.

Nous avons en outre exploré un autre système utilisant les mutants R17amB11 et R17amB17 dont les mutations se situent respectivement aux positions 50 et 54 - soit au milieu - de la protéine capsidiale. Ces mutants ont été testés dans une cellule sans supprimeur en espérant que les positions relativement distales de leurs mutations (qui, en tout cas pour R17amB11, ne montrent pas d'effet de polarité (78)) permettrait le déploiement du site d'initiation du cistron C tout en produisant de la protéine capsidiale incomplète donc - pensait-on - ne pouvant servir de répresseur.*/

b) expériences et résultats

Nous avons donc infecté, à la même multiplicité (4 à 5), les souches S26 su^- , S26RIE am su_I^+ , C600GF⁺/λ am su_{II}^+ , 112-12 oc su_7^+ et CA165 oc su_B^+ avec R17 sauvage (25'), R17amB2 (25' et 45'), et, sur S26 seulement les mutants R17amB17 (25' et 45') et R17amB11 (25' et 45'). Les résultats sont présentés dans la table 1 et sont exprimés en activités spécifiques relatives en ARN synthétase dans les extraits bruts calculées en % de celle atteinte par la même souche infectée pendant 25' avec le phage sauvage.

On constate que :

(1) en condition su^- , R17amB2 ne fournit pas une activité comparable à celle du phage sauvage, ce qui confirme les résultats de Gussin (78) : la mutation est trop proximale pour que l'ARN soit déployé et par conséquent pour que le site d'initiation de la synthétase soit démasqué.

(2) dans la souche S26RIE, dont l'efficacité de suppression est de 66 % (113), la synthétase est, à 25', surproduite environ quatre fois. A 45' toutefois la synthèse de synthétase a pratiquement cessé, la production de protéine capsidiale étant devenue suffisante pour la réprimer : la synthèse des protéines cellulaires a dilué l'enzyme et, par conséquent, abaissé son activité spécifique.

*/ des systèmes analogues ont été utilisés pour les purifications partielles des enzymes de MS2 (8) et de f2 (164).

(3) dans la souche C600GF⁺/λ, l'activité spécifique obtenue est plus élevée que dans S26RIE car il n'y a qu'un tiers de protéine capsidiale synthétisée, ce qui réduit d'autant la répression. A 45' toutefois, elle baisse pour les mêmes raisons que celles énoncées pour S26RIE.

(4) les deux souches ochres-suppresseurs montrent une très faible suppression, apparemment supérieure chez 112-12 que chez CA165. On retrouve à 25' d'infection des valeurs apparentées à celles obtenues dans les conditions su⁻; à 45' par contre la suppression a été suffisamment efficace pour que l'activité spécifique dépasse nettement les valeurs obtenues en su⁻ ou avec le phage sauvage. Il eût été intéressant de connaître le niveau d'activité environ 2 heures après l'infection mais cette expérience n'a pas été entreprise.

(5) les mutants R17amB17 et R17amB11 induisent, comme prévu, des surproductions, mais à des valeurs très différentes; une différence de quatre acides aminés (dans la position de la mutation) distingue ces deux mutants; il se pourrait que cette petite séquence comprenne un acide aminé dont la présence est essentielle lors de la liaison de la protéine capsidiale à l'ARN. Cette hypothèse est, en tout cas, compatible avec le fait que, tant chez R17 que MS2, f2 et fr (ce dernier ayant une composition en acides aminés de la protéine capsidiale très différente des autres (250)), les séquences des 35 acides aminés situés entre les positions 20 et 54 de la protéine sont communes. Ceci expliquerait l'effet de "cross repression" */ constaté entre ces phages et la spécificité avec laquelle la protéine capsidiale se lie à l'ARN (17).

L'emploi des mutants R17amB17 et R17amB11 n'a pas été retenu pour la purification de la synthétase enzymatique car ils croissent difficilement : leur rendement étant de 50 à 100 phages par bactérie (alors qu'il s'élève à 600 - 800 pour R17amB2 contre 1'500 à 3'000 pour le virus sauvage (78)), la sélection de révertants est considérablement favorisée et rend matériellement difficile la préparation de grandes quantités de cellules infectées nécessaires à la purification de l'enzyme. R17amB2 ne présente par contre ce désavantage qu'à un moindre degré.

Afin de déterminer à quel moment la production de synthétase est optimale, nous avons étudié la cinétique d'apparition de cette enzyme dans le système surproducteur C600GF⁺/λ + R17amB2. La figure 1 montre cette cinétique comparée à celle obtenue avec le phage sauvage; on constate que R17amB2 surproduit nettement de la synthétase entre les minutes 25 et 45 après l'infection. Il convient de préciser que l'activité globale en enzyme est plus élevée à 45' qu'à 25' mais que l'activité spécifique est au maximum à 25'. Comme il est préférable

*/ fait que la protéine capsidiale d'un phage (p.ex. MS2) peut réprimer la synthèse in vitro de la synthétase d'un autre phage (p.ex. R17) (45, 120, 233).

de posséder comme matériel de départ des cellules dont l'activité spécifique en synthétase est élevée, l'étude des facteurs affectant l'activité de l'enzyme dans les extraits bruts et les tentatives de purifications ont été entreprises avec des cellules infectées pendant 25'.

Table I : Activité spécifique relative en ARN synthétase dans les extraits bruts exprimée en % de celle de la

même souche infectée pendant 25' par le phage sauvage

25 erlenmeyers de 3 litres contenant 1,5 l. de "R broth" (Matériel et Méthodes) sont placés sur un agitateur rotatif, préchauffés à 37°C et inoculés avec 15 ml d'une suspension de cellules des souches bactériennes indiquées ayant poussé toute la nuit. L'expérience a été pratiquée en plusieurs fois, par série de 6 erlenmeyers. Lorsque la D.C. à 550 m μ de la culture atteint 0,5 unité (soit environ 10⁸ cellules par ml), les phages, dilués dans 250 ml de "R broth", lui sont ajoutés. C'est le temps zéro. L'agitation est d'abord lente pour permettre l'adsorption des virus ; 4 à 5 minutes après l'infection elle est portée au maximum. Après 25 ou 45 minutes d'infection (voir la table) la culture est très rapidement refroidie en l'agitant vigoureusement dans un mélange d'acétone et de glace carbonique en prenant soin de ne pas laisser se former une croûte de glace. Les cellules sont ensuite sédimentées par centrifugation au froid (0°C, 10 min. à 13000 x g dans le rotor GS3 de Sorvall) et congelées. Elles serviront ensuite à la préparation d'extraits bruts dans lesquels l'activité synthétase est dosée et exprimée en activité spécifique (μ moles GMP incorporées en 10 min. à 37°C par mgr de protéines). Pour les détails, voir Matériel et Méthodes. Chaque souche de cellules a été infectée par R17 sauvage et son activité spécifique considérée comme 100 %. Les résultats sont exprimés en % de cette activité spécifique trouvés dans la même cellule soit non infectée soit infectée par un mutant.

Table 1

Souches Caractéristiques supresseurs		S26 su ⁻				
Efficacité de suppression		0	S26RIE am su ⁺ _I	C6006F+/ λ am su ⁺ _{II}	112-12 oc su ⁺ _?	CA 165 oc su ⁺ _B
Origine		R.R. Burgess				
Phages	Durée infection					
non infecté	25'	7	11	13	10	13
R17amB2	25'	15	390	564	80	21
	45'	33	250	486	271	175
R17amB17	25'	197				
	45'	210				
R17amB11	25'	440				
	45'	284				

a) Kaplan, Stretton et Brenner (1965) J.Mol.Biol. 14, 528

b) Brenner et Beckwith (1965) J.Mol.Biol. 13, 629
cette valeur concerne l'efficacité de suppression de
la mutation ochre et non de la mutation amber.

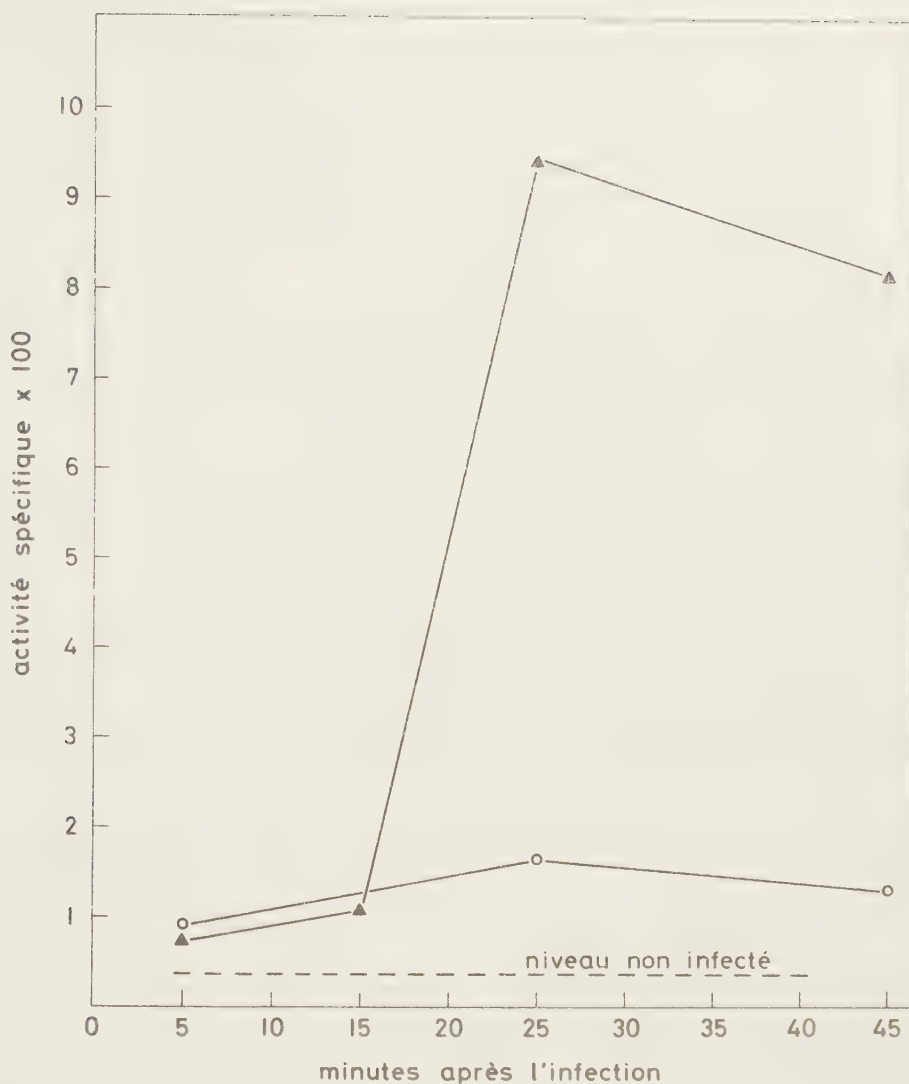


Figure 1 : cinétique d'apparition de l'ARN synthétase dans le système surproducteur

Trois erlenmeyers de 3 litres contenant 2 litres de "R broth" (voir Matériel et Méthodes) sont placés sur un agitateur rotatif, préchauffés à 37°C et inoculés avec trois fois 15 ml d'une culture de C600GF⁺/λ ayant crû toute la nuit. Lorsque la densité optique à 550 mμ des cultures atteint 0.5 unité (environ 10⁸ cellules/ml), un erlenmeyer est infecté avec 250 ml d'une suspension diluée de R17 sauvage, un autre avec 250 ml de R17amB2 (multiplicité d'infection pour les deux : 5 à 6) alors que le troisième erlenmeyer est rapidement refroidi dans un mélange d'acétone et de glace carbonique (contrôle non-infecté). 5, 15, 25 et 45 minutes après l'infection, des échantillons de 500 ml sont prélevés, refroidis, sédimentés (voir table 1), lavés une fois avec du "R broth" et congelés dans des tubes Corex. Ils serviront à la préparation d'extraits bruts (voir Matériel et Méthodes).

Les résultats sont exprimés en activité spécifique (μmoles de GMP incorporées en 10 minutes à 37°C par mgr de protéines de l'extrait brut).

○ — ○ C600GF⁺/λ + R17 sauvage
 ▲ — ▲ C600GF⁺/λ + R17amB2

Chapitre 2

ETUDES DES FACTEURS AFFECTANT L'ACTIVITE DE L'ARN SYNTHETASE DE R17

DANS LES EXTRAITS BRUTS

Une des conditions essentielles à la purification d'une enzyme est la mise au point d'un dosage d'activité qui soit satisfaisant. Ceci nécessite une étude de l'effet de différents paramètres sur l'activité enzymatique. Ce chapitre lui est consacré.

a) Linéarité du dosage en fonction du temps et de la concentration d'enzyme

Des portions de 25 μ l d'extrait brut traité à la DNase ont été dosés (voir Matériel et Méthodes) en absence ou en présence de rifampicine (ceci afin de tester la résistance de la synthétase de R17 à cette antibiotique), durant 0, 5, 10, 20, 40 et 60 minutes. Les résultats sont indiqués sur la figure 2A et montrent que l'activité enzymatique possède une cinétique linéaire durant 5 à 10 minutes puis progressivement s'infléchit pour atteindre un plateau après 30 à 35 minutes. Nous verrons plus loin que ce plateau n'est dû

- ni à l'épuisement du substrat (§ c);
- ni à un manque d'ARN matriciel (§ e);
- ni à une inactivation de l'enzyme par la température (§ d).

Cette cessation d'activité, en contradiction avec Spiegelman et coll. (211), sera étudiée plus loin.

Dans une autre expérience, des quantités croissantes d'extrait brut ont été dosées dans les mêmes conditions. Les résultats sont indiqués sur la figure 2B; on constate que le dosage est linéaire entre 1 à 2 μ l et 25 à 30 μ l d'extrait brut.

b) effets de la température et des concentrations en K^+ et en Mg^{++}

Nous avons examiné les cinétiques d'incorporation du GTP à toute une série de températures s'étageant de 0° à 60°C (au delà, il se forme un précipité floconneux). Les résultats sont indiqués sur la figure 3A.

On constate que l'optimum de température de la synthétase se situe entre 30 et 40°C et, par conséquent, que la température de 37°C utilisée de façon routinière convient à l'enzyme. Il est intéressant de remarquer que

- (1) la synthétase polymérise même à 0°C (voir chapitre 3) et
- (2) que le produit précipitable au TCA de sa réaction est détruit au dessus de 40°C; nous ne voyons pas d'explication évidente à ce fait (éventuellement activation d'une nucléase à haute température (par ex. RNase ribosomale (208))).

Nous avons par ailleurs étudié les cinétiques d'incorporation du GTP en présence de molarités croissantes de KCl. Les résultats sont indiqués sur la figure 3B et montrent qu'une augmentation de la concentration en KCl entraîne une diminution des produits marqués précipitables au TCA (même remarque que ci-dessus). Comme dans les dosages habituels on n'ajoute pas de KCl, on peut estimer que les conditions utilisées, pour ce sel, sont optimales.

Une expérience identique a été entreprise avec des concentrations croissantes de $MgCl_2$. Il faut noter qu'il n'a pas été possible de doser l'enzyme à moins de 4 mM Mg^{++} : cette molarité provient en effet du tampon TGE utilisé pour préparer l'extrait brut. Les résultats sont indiqués sur la figure 3C et montrent un optimum de concentration entre 10 et 40 mM de Mg^{++} . Les dosages de routine s'effectuant à 16 mM (12 provenant du mélange de dosage et 4 du tampon TGE de l'extrait brut dilué), ils se situent dans la zone optimale.

c) effet de la concentration en nucléosides triphosphates

Dans les conditions standard de dosage, l'activité enzymatique cesse après environ 20 à 30 minutes d'incubation (voir § a); à ce temps, environ 1 à 2 % seulement de la radioactivité est incorporée dans du matériel précipitable au TCA. Il était possible que cette faible incorporation soit due à un manque de substrat, la majorité des nucléosides triphosphates (NTP) pouvant être très rapidement hydrolysés par l'extrait brut (activité triphosphatasique). Afin d'éliminer cette possibilité, on a varié les concentrations en NTP.

Les résultats sont présentés sur la figure 4 et montrent qu'un doublement de la concentration de tous les NTP par rapport aux concentrations standard, n'affecte que très légèrement le niveau d'incorporation. L'addition de plus fortes concentrations a pour effet d'inhiber considérablement l'activité. On pourrait expliquer cette inhibition par le fait que les concentrations molaires

de Mg^{++} , une partie de ce sel serait complexée par les triphosphates : la réduction d'activité observée serait donc un effet indirect des NTP.

Quoi qu'il en soit, il apparaît que la faible incorporation observée n'est pas due à un manque de substrat.

d) effets de traitements préalables de l'extrait brut sur l'activité enzymatique

La faible activité enzymatique observée dans les extraits bruts nous a incité à effectuer quelques essais de traitements de la préparation avant d'en doser l'activité enzymatique. Il était en effet possible que cette dernière soit "masquée" dans l'extrait brut (c'est une situation couramment observée au cours de la purification d'enzymes). Ces essais s'étant avérés négatifs, nous n'en citerons brièvement que deux.

1) Autodégradation (par analogie à la RNase I (208))

Les conséquences d'une autodégradation de l'extrait brut à l'EDTA sur l'activité enzymatique de la synthétase sont montrées sur la figure 5. On constate que l'enzyme perd 25 % de son activité en 2 minutes, 50 % en 7 minutes et demie et environ 75 % en une demi-heure. Ces résultats indiquent que l'EDTA exerce directement ou indirectement une nette action dépressive sur l'activité de la synthétase.

2) Chromatographie sur Séphadex

La chromatographie sur Séphadex G-50 dans du tampon TG de l'extrait brut avait pour but de séparer l'enzyme de composés à bas P.M. qui pourraient inhiber l'activité polymérisante de la synthétase. Les résultats de ces essais (qui ne sont pas montrés ici) indiquent que l'enzyme supporte bien cette opération mais que sa cinétique n'en est nullement améliorée.

e) effet de l'addition de divers ARN sur l'activité enzymatique

Les résultats des expériences décrites jusqu'ici, ainsi que ceux d'autres expériences, suggèraient que la synthétase, dans nos conditions de dosage, ne faisait que de terminer les chaînes d'ARN sur lesquelles elle se trouvait adsorbée au moment de la préparation de l'extrait brut. Elle n'était donc plus à même de réinitier in vitro de nouvelles synthèses. Ceci expliquerait la cessation (fig 2A)

de l'incorporation des NTP au cours du dosage. Si cette hypothèse était exacte, on devrait s'attendre à ce que la taille des produits soit en moyenne faible et d'autre part à ce que l'addition d'ARN relance l'activité enzymatique.

1) analyse des produits de synthèse in vitro de la synthétase

Nous avons tout d'abord examiné la taille des produits synthétisés in vitro dans nos conditions expérimentales; dans une première partie de l'expérience, nous avons examiné les produits bruts de la synthétase. Les résultats sont indiqués sur la fig. 6A : on constate qu'il n'y a pas de matériel de haut P.M. et que l'enzyme accumule au cours du temps des produits de relativement petite taille. Il faut remarquer qu'on ne trouve pas, comme on aurait pu s'y attendre, de complexe enzyme-produit montrant un coefficient de sédimentation élevé.

Il se pouvait toutefois que la petitesse du produit provienne d'une dégradation ultérieure à la mise sur gradient. Nous avons par conséquent analysé sur gradient les produits extraits au phénol. Les résultats de cette deuxième partie de l'expérience sont indiqués sur la figure 6B : on constate que la synthétase polymérise peut-être une infime fraction de matériel dont le P.M. est comparable à celui de l'ARN viral mais que la majeure part de l'activité mesurée correspond à des polynucléotides de tailles égales ou inférieures à celle de l'ARN de transfert.

2) effet de l'addition de divers ARN sur l'activité de la synthétase

Il était possible que la petitesse de ces produits soit due à la destruction du substrat matriciel de l'enzyme et que, contrairement à ce qui se passe pour la réplique de Q β (9), l'enzyme de R17 manquât, déjà dans un extrait brut, d'ARN complet sur lequel elle pût polymériser. Nous avons par conséquent essayé d'ajouter divers ARN en cours de dosage. Seuls quelques exemples d'essais seront reportés ici.

Un premier type d'expériences consistait à ajouter de l'ARN viral (de brin "+") à divers moments du dosage. La figure 7 montre les résultats typiques de trois groupes de cas étudiés : on constate dans la partie A que la cinétique d'incorporation d'une même quantité d'enzyme s'avère nettement déprimée par la présence d'ARN dans le mélange de dosage; la partie B montre que si l'on ajoute de l'ARN viral après 20 minutes de dosage (plateau de l'activité), l'activité n'est pas relancée. Si, finalement, on ajoute, en plus de l'ARN, une quantité équivalente à celle du dosage de milieu frais de dosage, les résultats (non montrés ici) sont identiques à ceux de la partie B de la figure 7. La partie C montre que la cinétique d'incorporation en fonction d'une quantité croissante d'extrait brut est, elle aussi, déprimée par l'addition d'ARN viral.

Des expériences analogues, pratiquées avec d'autres concentrations d'ARN ajoutées à divers moments sur des extraits bruts préparés avec des méthodes différentes, conduisirent à des résultats identiques à ceux de la figure 7.

Un deuxième type d'expérience consistait à extraire au phénol de l'ARN de cellules infectées (donc riches en formes répliquatives) et à l'ajouter, après l'avoir dénaturé ou non à la chaleur (4), au mélange de dosage soit au départ de l'incubation, soit en cours d'incorporation. Les résultats concernant l'action d'ARN extrait de cellules infectées durant 25 minutes sont indiqués sur la figure 8 (les résultats avec des ARN extraits de cellules infectées avec d'autres temps sont identiques à ceux de la fig. 8). On constate que ces additions n'ont aucun effet positif sur l'activité in vitro de la synthétase.

Il ne paraissait donc pas possible de relancer l'activité de la synthétase par l'addition de matrice naturelle.

f) effet de l'addition de polynucléotides synthétiques sur l'activité
de la synthétase

La réplicase de Q β utilise le poly-C comme matrice (46); il était donc raisonnable d'étudier l'activité de la synthétase de R17 sur ce polymère. La table 2 montre que la synthétase, en extrait brut, n'utilise pas le poly-C comme matrice.

Dans d'autres expériences, nous avons constaté que la synthétase de R17, en extrait brut, n'utilise pas non plus comme matrice d'autres homopolymères synthétiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par August et coll. (8) pour la synthétase purifiée de f2.

Table 2

milieu de dosage	mmoles incorporées		GMP / UMP
	GMP	UMP	
complet sans poly-C	0.91	1.09	0.83
complet avec poly-C	0.89	0.98	0.91
sans ATP, CTP, UTP sans poly-C	0.56	-	1.06
sans ATP, CTP, GTP sans poly-C	-	0.53	
sans ATP, CTP, UTP avec poly-C	0.615	-	1.00
sans ATP, CTP, GTP avec poly-C	-	0.615	

Table 2 : action du poly-C sur l'activité de la synthétase en extrait brut

10 µl d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosés (voir Matériel et Méthodes) avec les omissions indiquées en présence ou en absence de poly-C (50 µgr par dosage) en suivant l'incorporation de GTP marqué et d'UTP marqué comme contrôle.

g) effet de l'addition d'extraits bruts sur l'activité de la synthétase

Il n'était pas exclu de penser que l'activité synthétase dépendait d'un facteur labile présent en plus grandes quantités à certains moments de l'infection qu'à d'autres. Ce facteur labile se dénaturerait durant le dosage et provoquerait l'arrêt de la cinétique. En ajoutant des extraits bruts de temps divers, il était donc possible que l'on obtienne une activité synthétase plus grande que la somme des activités isolées fournies.

Le résultat d'une telle étude est fourni sur la table 3 et ne montre aucun effet synergique entre les différents extraits bruts testés. Ces derniers, quelles que soient leur combinaisons, n'ont pas permis de remarquer des différences de cinétique que ce soit en présence ou en absence d'ARN ajouté (résultats non montrés ici).

Table 3

Extraits bruts provenant de cellules infectées pendant	CPM incorporés	
	calculés	expérimentaux
5'	-	0
15'	-	1'128
25'	-	1'844
5' + 15'	1'128	974
5' + 25'	1'844	1'736
15' + 25'	2'972	2'953
5' + 15' + 25'	2'972	2'967

Trois extraits bruts (C600GF⁺/λ + R17amB2) issus de cellules infectées respectivement pendant 5, 15 et 25' (voir légende de la Table 1) et préparés simultanément sont dosés individuellement (10 µl) et en association comme décrit sous Matériel et Méthodes.

Figure 2 : linéarité du dosage en fonction du temps et de la concentration d'enzyme

A.- En fonction du temps :

Des échantillons contenant 25 µl d'extrait brut (voir Matériel et Méthodes) traité à la DNase et provenant d'une culture de C600GF⁺/λ infectée pendant 25' par R17amB2 sont dosés comme décrit dans Matériel et Méthodes pendant des temps variables en présence ou en absence de 10 µgr de rifampicine par dosage.

● ————— : avec rifampicine ○ ————— : sans rifampicine

B.- En fonction de la concentration d'enzyme :

Des échantillons contenant les quantités d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') indiquées en abscisse sont dosées comme décrit sous Matériel et Méthodes.

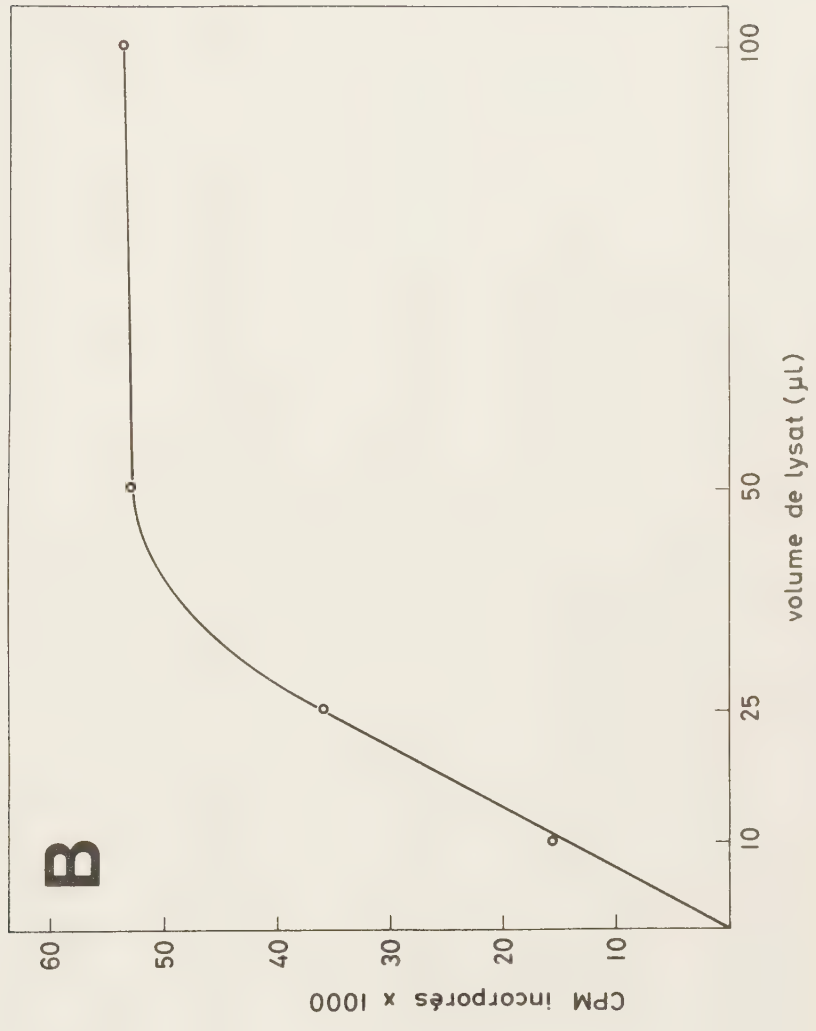
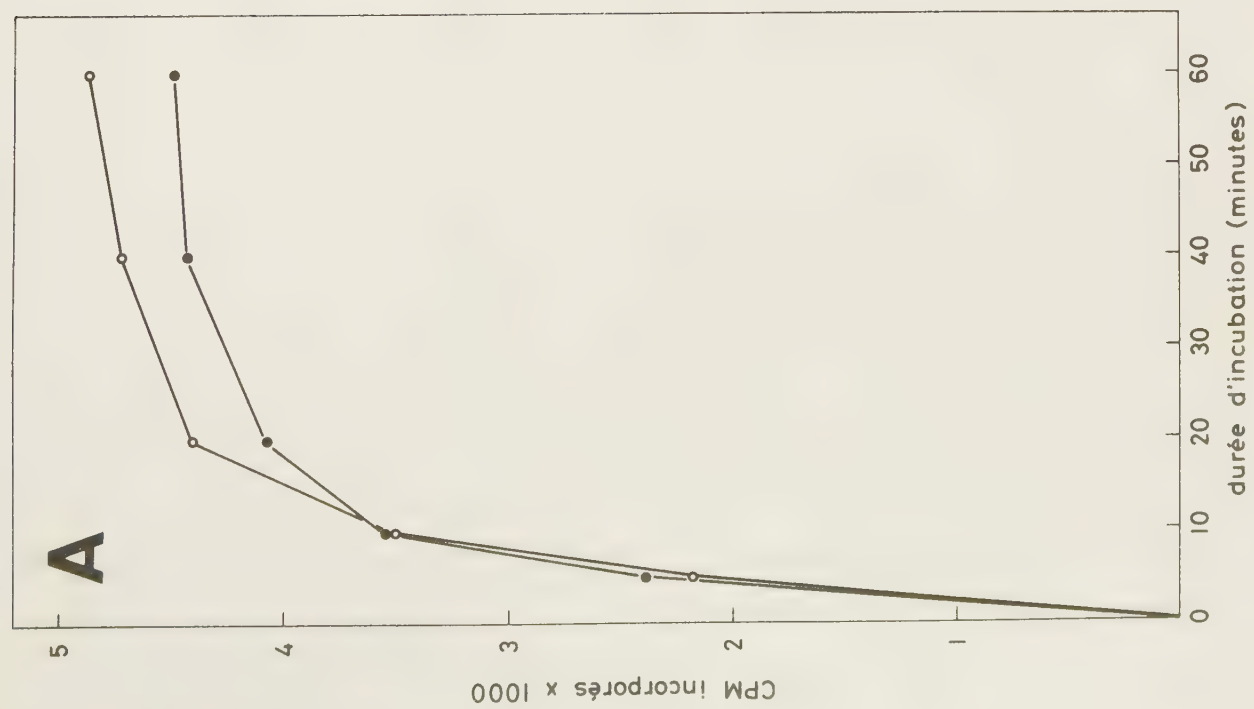


fig. 2

Figure 2 : effets de la température et des concentrations en K^+ et en Mg^{++}

A.- effet de la température :

Des échantillons de 20 μ l d'extrait brut (C600GF⁺/ λ + R17amB2, 25') ont été dosés (voir Matériel et Méthodes) durant 0, 5, 10, 20 et 40 minutes à 0°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50° et 60°C.

B.- effet de la concentration en K^+ :

Des échantillons de 25 μ l d'extrait brut (idem ci-dessus) ont été dosés (voir Matériel et Méthodes) pendant 0, 10, 20 et 40 minutes en présence des molarités de KCl indiquées en abscisse (la concentration de Mg^{++} étant constante : 16 mM).

C.- effet de la concentration en Mg^{++} :

Des échantillons de 20 μ l d'extrait brut (idem ci-dessus) sont dosés comme décrit dans Matériel et Méthodes mais en présence de molarités croissantes de Mg^{++} .

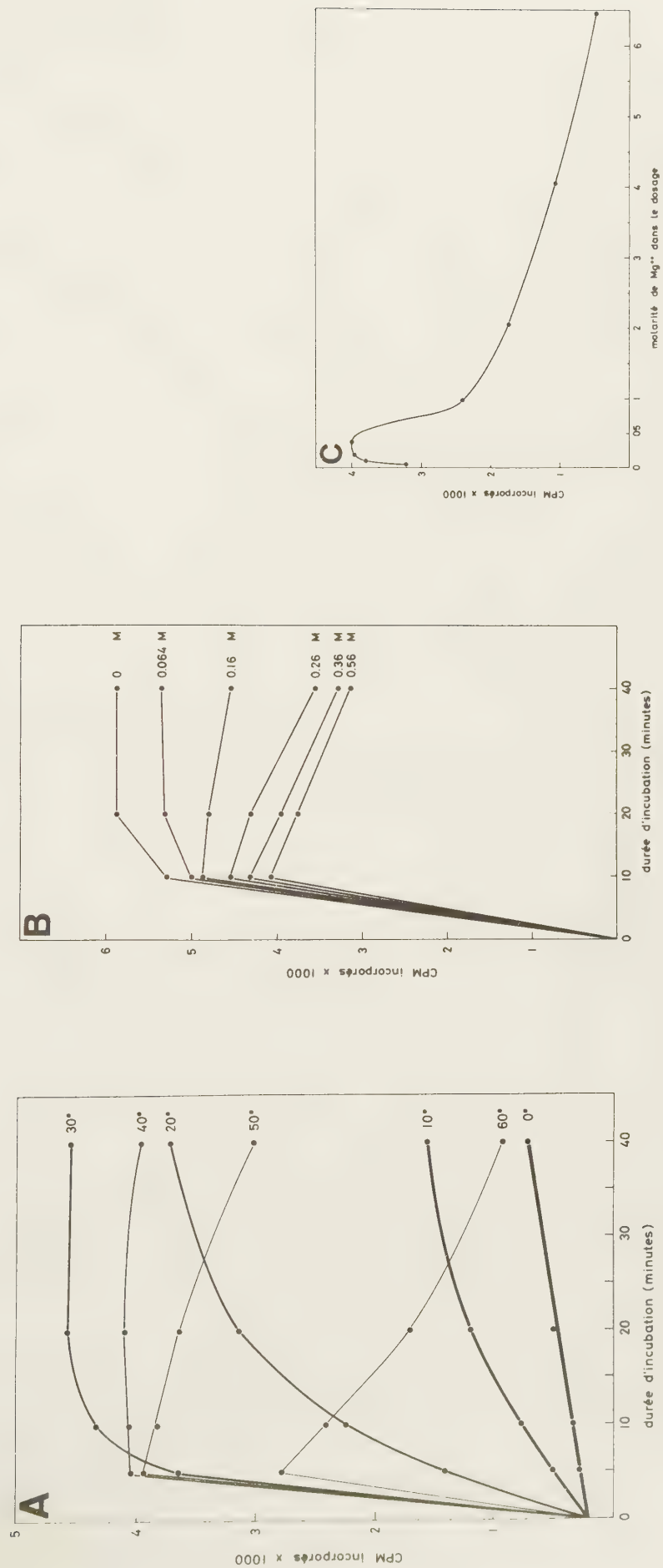


fig. 3

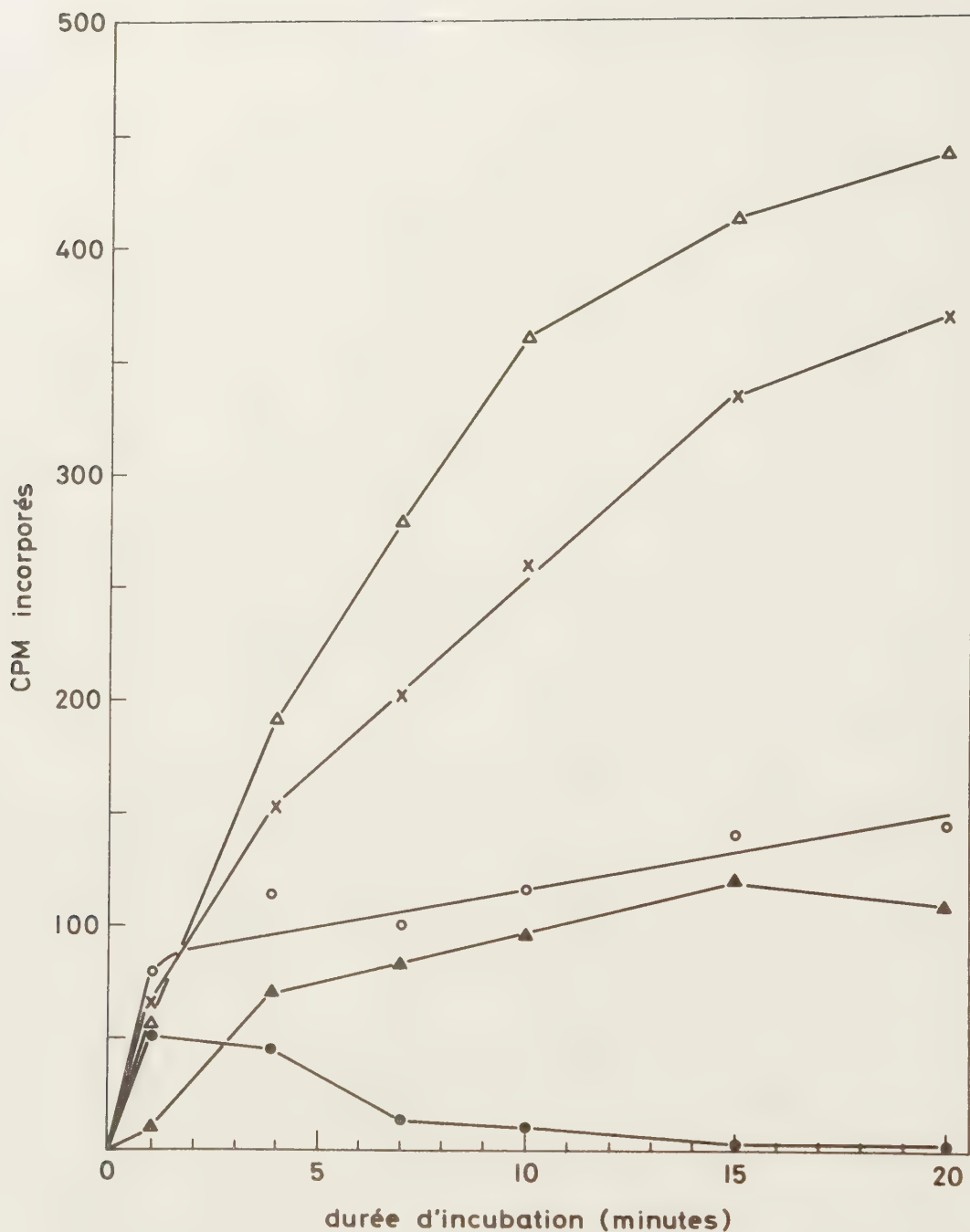


Figure 4 : effet de la concentration en NTP

Des échantillons de 10 μ l d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosés (voir Matériel et Méthodes) durant 0, 1, 4, 7, 10, 15 et 20 minutes en présence de concentrations variables de NTP (voir ci-dessous). Les valeurs du temps zéro (de l'ordre de grandeur de 50 CPM) ont été soustraites dans chaque cas).

- x — x concentrations normales des 4 NTP
- Δ — Δ concentrations doubles des 4 NTP
- o — o concentrations triples des 4 NTP
- ▲ — ▲ concentrations normales en UTP, CTP et GTP mais 10 fois celle ATP
- — ● concentrations quintuples en UTP, CTP, ATP mais normale de GTP.

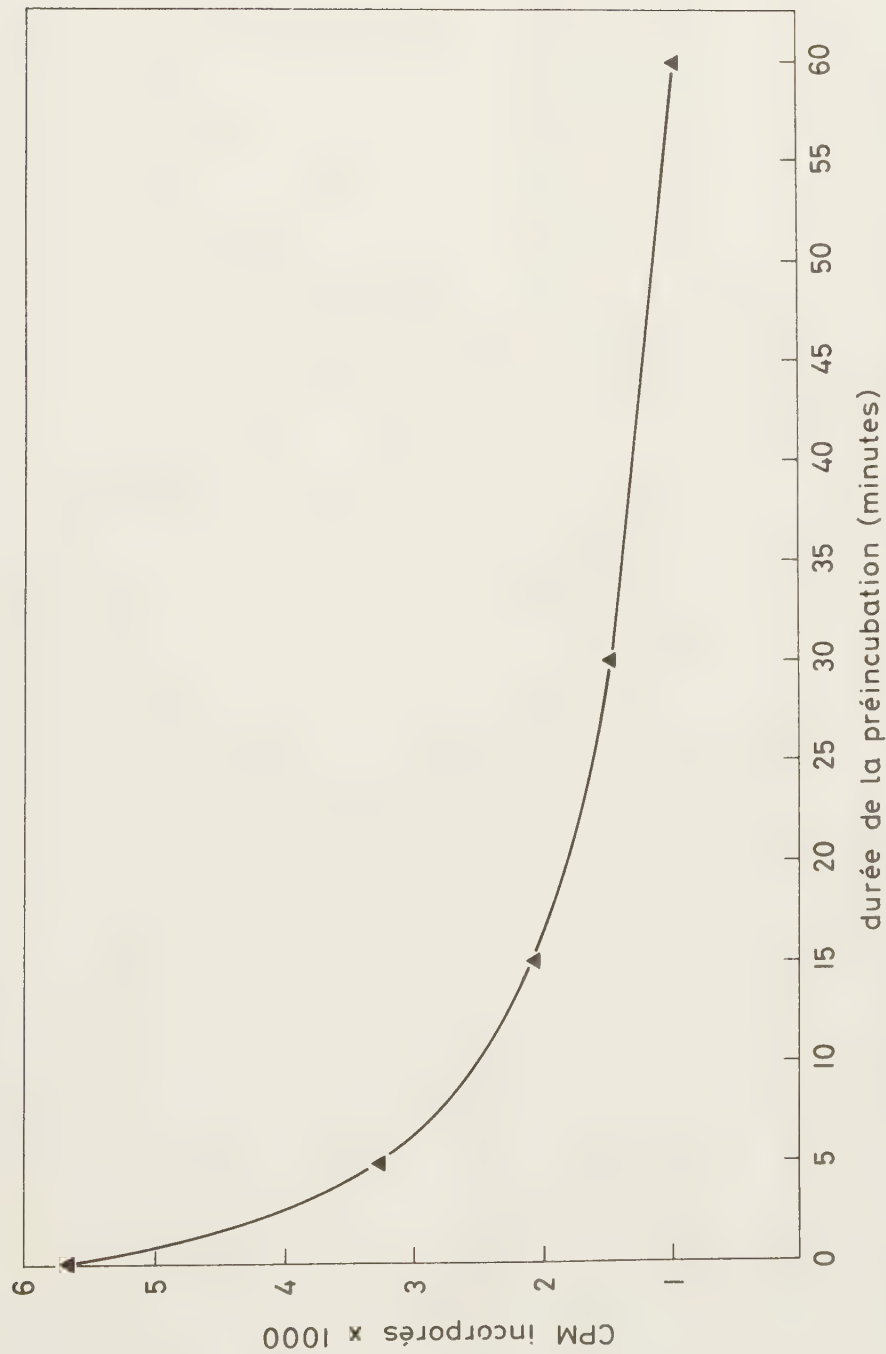


Figure 5 : effet de l'autodégradation d'un extrait brut à l'EDTA sur l'activité de la synthétase

Une quantité stock d'extrait brut ($\text{C600GF}^+/\lambda + \text{R17amB2}, 25'$) préparée dans le tampon TG est portée à 0.01 M EDTA (avec une solution 0.1 M neutralisée) puis incubée à 30°C. Après 0, 5, 15, 30 et 60 minutes de préincubation, des aliquots de 100 μl (correspondant à 20 μl d'extrait brut) sont dosés comme décrit sous Matériel et Méthodes.

Figure 6 : analyses des produits de synthèse in vitro de la synthétase

A : analyse des produits bruts : 50 μ l d'extrait brut (S26RLE + R17amB2, 25') ont été dosés (voir Matériel et Méthodes) durant 0, 6, 10, 20, 30 et 40 minutes. Ils sont ensuite rapidement refroidis et, après addition de 20 μ l de Na₄P₂O₇ 0.2 M pour stopper la réaction, dilués deux fois avec de l'eau puis immédiatement déposés à la surface de gradients de saccharose 10 à 30 % (0.1 M Tris pH²⁵ = 8.0, 0.01 M MgCl₂ et 0.1 M β -mercaptoéthanol) et centrifugés (rotor SW 41, 2°C, 10 heures à 35'000 TPM). Les gradients (30 fractions) sont collectés directement dans des fioles à scintillation. Après addition de 10 ml de Kinard (voir Matériel et Méthodes), la radioactivité est mesurée. Les valeurs de 20 et 30 minutes, intermédiaires à celles de 10 et 40', ne sont pas indiquées pour ne pas surcharger le graphique. —●— 6 min.; x—x 10 min.; ○—○ 40 min.; ↓ : position de l'ARN viral marqueur.

B : analyse des produits après extraction au phénol : 100 μ l d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosés (voir Matériel et Méthodes) pendant 10 minutes. Après extraction au phénol (70), le matériel synthétisé est déposé à la surface d'un gradient de saccharose 5 à 20 % contenant 0.1 M NaCl et 0.01 M Na ac. pH 4.6 (210) et centrifugé (rotor SW 27, 2°C, 14 heures à 27'000 TPM). Deux gradients parallèles contiennent comme marqueurs de l'ARN viral marqué au P³² (préparé par P.F. Spahr (72)) et de l'ARN ribosomique. Les fractions sont traitées comme ci-dessus. ○—○ radioactivité P³² de l'ARN marqueur; ●—● D.O.260 de l'ARN ribosomique; ▲—▲ radioactivité du produit de la synthétase.

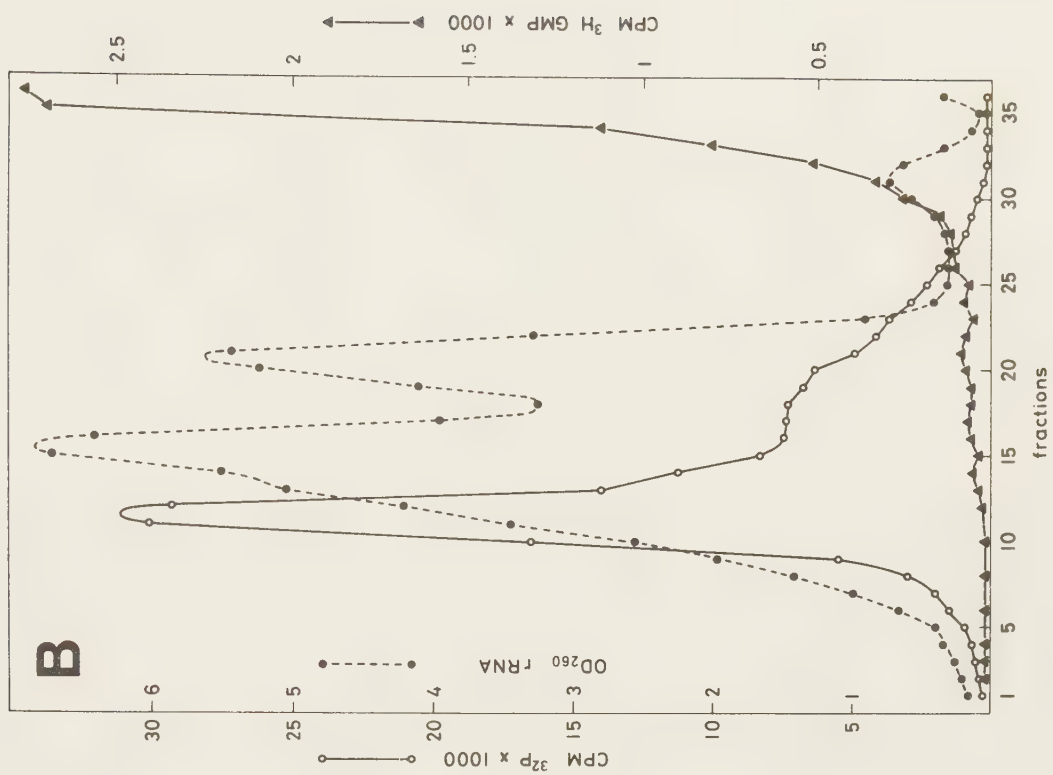
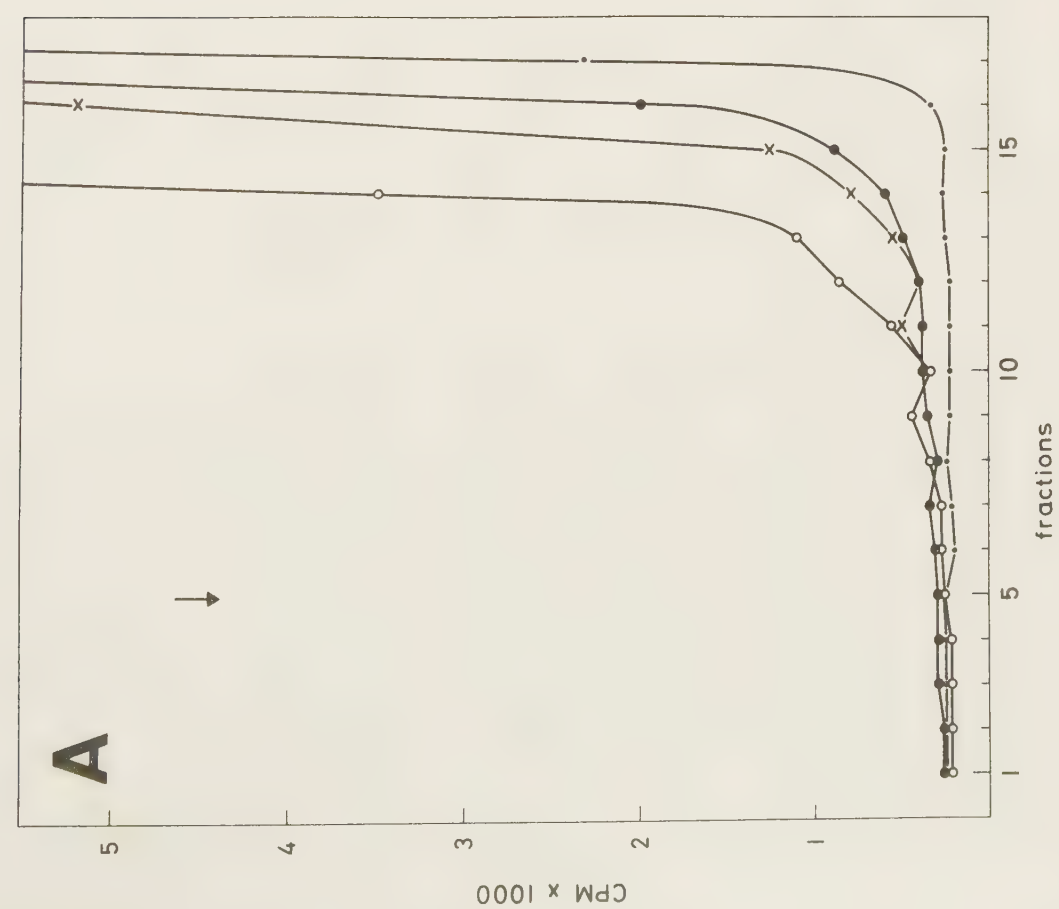


fig. 6

Figure 7 : effet de l'addition de divers ARN sur l'activité de la synthétase

A : addition d'ARN viral en début de dosage :

50 µl d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosés (voir Matériel et Méthodes) durant 0, 5, 10, 22 et 40 minutes en présence ou en absence de 30 µgr d'ARN viral de brin "+". ○ —○ sans addition d'ARN; ● —● avec addition d'ARN.

B : addition d'ARN viral en cours de dosage :

Une quantité d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') est dosée (voir Matériel et Méthodes); des échantillons sont prélevés 0, 5, 10 et 20 minutes après le début de l'incubation et traités normalement. A 20', la solde est divisé en deux parties : l'une est incubée sans addition, l'autre avec une quantité totale d'ARN correspondant à 45 µgr par dosage. Des échantillons sont ensuite prélevés aux temps indiqués dans la figure et traités normalement (le volume des échantillons auxquels on a ajouté de l'ARN a été corrigé). ● —● sans addition d'ARN; ○ —○ avec addition d'ARN.

C : addition d'ARN viral sur des quantités croissantes d'extrait brut :

Des quantités croissantes d'extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosées (voir Matériel et Méthodes) en présence ou en absence de 30 µgr d'ARN viral par dosage. ○ —○ dosage en absence d'ARN ajouté; ● —● dosage en présence d'ARN.

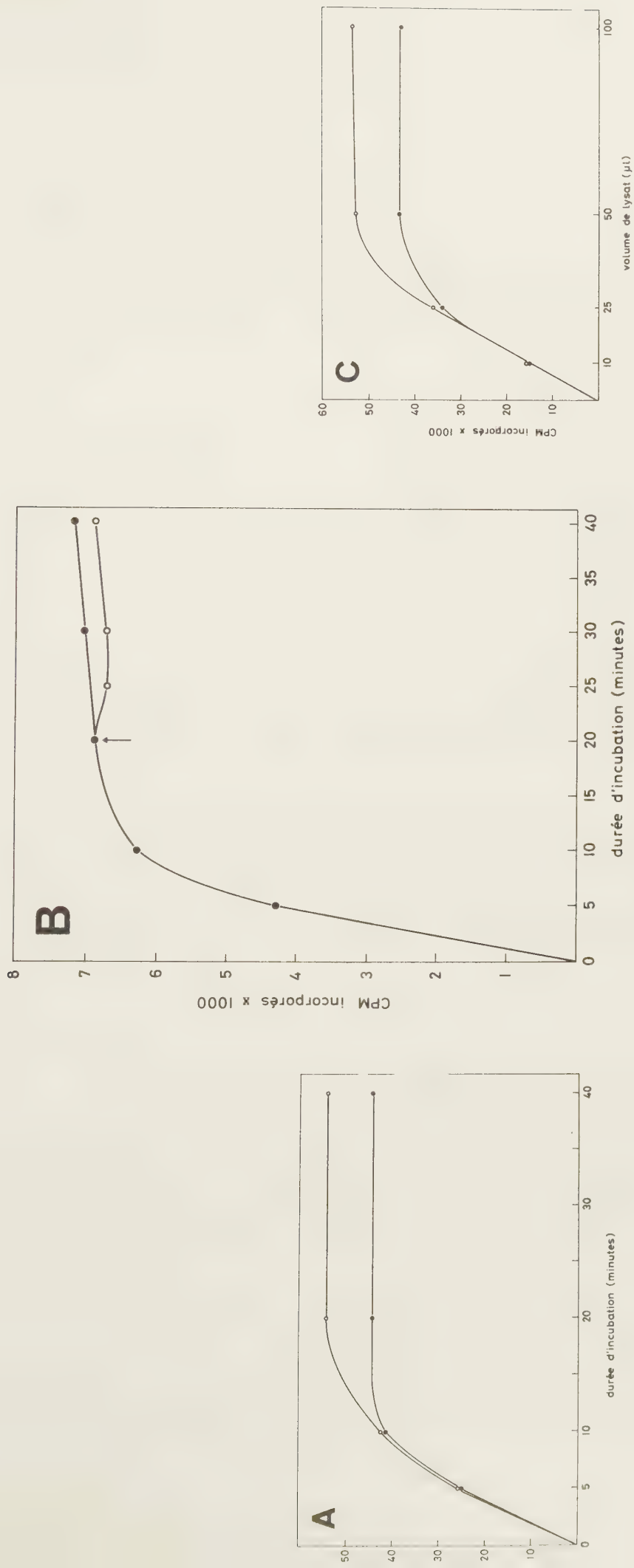


fig. 7

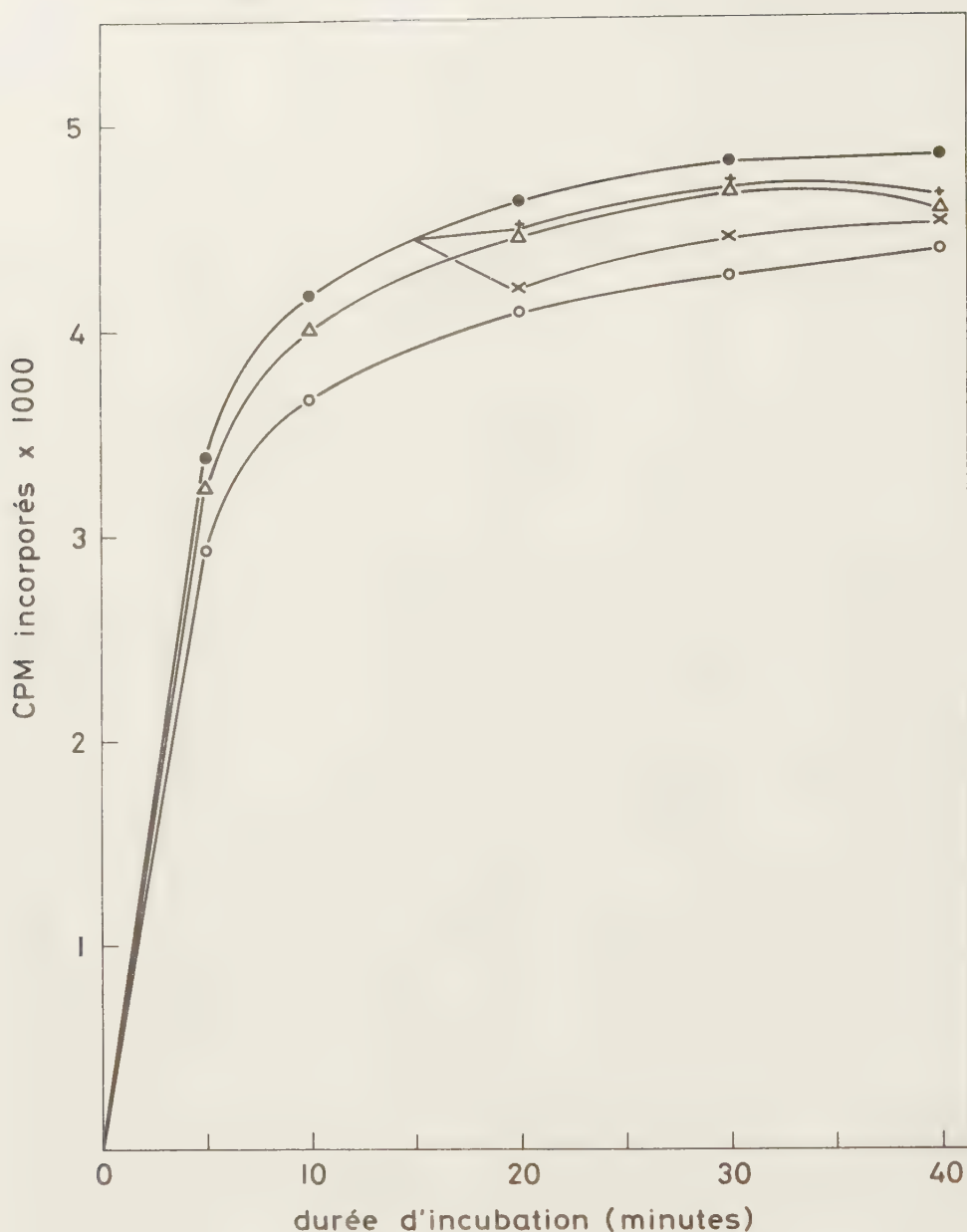


Figure 8 : additions d'ARN extrait de cellules infectées

Une culture en "R broth" de 1.5 litre de C600GF⁺/λ, infectée avec R17amB2 (multiplicité = 5), est arrêtée (voir légende de la table 1) après 25 minutes d'infection; les cellules sont sédimentées, lavées dans le tampon TG et broyées (voir Matériel et Méthodes) en présence de DNase. L'ARN est ensuite extrait au phénol (70, 11) et, quand il y a lieu, dénaturé (4). 10 μl d'un extrait brut (C600GF⁺/λ + R17amB2, 25') sont dosés en présence ou non de 85 μgr d'ARN extrait de cellules infectées (voir ci-dessus) et les échantillons traités comme décrit sous Matériel et Méthodes.

●—● extrait brut sans addition; ○—○ avec ARN non dénaturé au temps zéro; △—△ avec ARN dénaturé au temps zéro; ×—× avec ARN non dénaturé à 15 minutes; +—+ avec ARN dénaturé à 15 minutes.

Chapitre 3

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA SYNTHETASE ENZYMATIQUE

a) Introduction

Le bilan que l'on peut tirer des études du chapitre précédent montre que la méthode de dosage, malgré de nombreuses tentatives, n'a pu être améliorée. En outre aucun indice permettant de croire que l'activité enzymatique pourrait devenir dépendante de l'addition de matrice ne fut trouvé.

Toutefois, malgré ses limitations, la méthode de dosage utilisée permettait de suivre une activité enzymatique et il n'était pas absurde de penser qu'après une ou deux étapes de purification l'enzyme pourrait se montrer dépendante de l'addition d'ARN matriciel ajouté; des cas analogues sont fréquents lors de la purification d'enzymes.

Néanmoins, les expériences ultérieures ont montré que la synthétase est très rapidement inactivée dès que les conditions d'extrait brut sont quittées. Dès lors, afin de ne pas nous étendre sur des résultats négatifs, nous ne donnerons dans ce chapitre que les grandes lignes et les résumés des diverses tentatives qui ont été entreprises.

b) précipitations au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est une technique très utilisée en purification d'enzyme; il était donc logique de commencer par elle. La table 4 montre les résultats d'un de nos essais : on constate que l'activité synthétase ne résiste pas à cette précipitation. Nous avons par conséquent essayé, dans les expériences ultérieures, des méthodes de séparation moins brutales que la précipitation avec un sel.

Table 4 : précipitation de la synthétase de R17 au sulfate d'ammonium

Un extrait brut (C600dF⁺/λ + R17amB2, 25') est centrifugé à 50'000 TPM (rotor Ti 50) pendant deux heures à 4°C pour sédimenter les ribosomes. Le surnageant est ensuite dilué à 4 mgr de protéines par ml (208) avec du tampon TG et les protéines graduellement précipitées à 4°C par l'addition de sulfate d'ammonium : 170 mg/ml pour passer de 0 à 30 % de saturation, 125 mg/ml pour passer de 30 à 45 %, 135 mg/ml pour passer de 45 à 60 % et 220 mg/ml pour passer de 60 à 90 % de saturation. Les précipités sont collectés par centrifugation, redissouts dans 3 ml de tampon TG puis dialysés à la chambre froide pendant 6 heures contre le même tampon (deux changes de deux litres). Les sacs sont ensuite ouverts, la concentration en protéines et l'activité synthétase dosées (synthétase) en présence ou en absence de 45.5 µgr d'ARN viral par dosage.

Table 4

Etapas	protéines		activité synthétase					
			sans addition ARN			avec addition ARN		
	mgr	%	μmoles GMP incorporées	rendement %	activité spécifique a)	μmoles GMP incorporées	rendement %	activité spécifique a)
extrait brut	69.65	100	35'758	100	513.4	-	-	-
idem - ribosomes	57.6	83	32'400	91	562.5	-	-	-
fractionnement au sulfate d'ammonium								
	traces	-	traces	--	--	traces	--	--
	11.5	20	1'145	3.5	99.6	1'341	4.1	116.6
	17.8	31	2'995	9.2	168.3	2'911	9.0	168.0
60 - 90 % sat.	16.0	28	305	0.9	19.1	290	0.9	18.1
Total	45.3	79	4'445	13.7	-	4'542	14.0	-

a) μmoles GMP incorporées par mgr de protéines.

c) fractionnement au sulfate de protamine

Le fractionnement au sulfate de protamine est une méthode de séparation extrêmement douce; nous avons suivi la procédure décrite par Haruna et Spiegelman (83) pour la purification partielle des réplicases de Q β et de MS2 : elle comprend la préparation d'un extrait brut par lyse au lysozyme, une dégradation à l'EDTA (voir Ch. 2 § d) puis deux fractionnements successifs au sulfate de protamine avec, entre eux, une élution de l'enzyme du précipité par le sulfate d'ammonium. D'après Haruna et Spiegelman, les deux enzymes montrent, à la fin de ces opérations, une bonne dépendance de l'addition d'ARN viral. Ces auteurs ne fournissent malheureusement pas de tables de purifications, si bien qu'il ne nous est pas possible de comparer nos résultats avec les leurs.

Nous avons remarqué que, lors du premier fractionnement déjà, les 4/5 de l'activité synthétase sont perdus; lors du deuxième fractionnement l'activité enzymatique, qu'elle soit mesurée avec ou sans ARN viral ajouté et que ce soit en basse ou en haute force ionique (0.33 M KCl ou 0.1 M sulfate d'ammonium (82)), ne représente plus que 0.6 % de l'activité utilisée au début de l'expérience. Comme il était possible qu'une protéine ou un facteur important ait été séparé de l'enzyme au cours d'un fractionnement, on a recombiné l'éluat du précipité du deuxième fractionnement avec son propre sur-nageant : on devait ainsi retrouver les conditions d'avant la séparation; mais que ce soit en présence ou en absence d'ARN viral ajouté (6 μ gr par dosage), il a été constaté que l'enzyme ne recouvrait, même pas partiellement, son activité.

D'autres tentatives de fractionnement au sulfate de protamine ont été entreprises avec des lysats de divers temps d'infection, des concentrations variées de protamine et d'autres méthodes (82), mais elles ont toutes abouti au même résultat.

Il semble donc que la synthétase de R17 soit irréversiblement dénaturée lorsqu'on la sépare de sa matrice endogène.

d) fractionnement par ultracentrifugation dans des gradients de
glycérol ou de saccharose

L'étude de la sédimentation de l'enzyme dans des gradients de glycérol et de saccharose a fourni des résultats intéressants quant à la façon dont l'enzyme se présente dans un extrait brut mais l'activité récupérée est très faible.

Par exemple, 7995 unités de synthétase (8.2 mg de protéines d'extrait brut sans ribosomes) centrifugées (rotor SB 110 d'International, 0°C, 22 heures à 25'000 TPM) dans un gradient de glycérol de 10 à 30 % (0.01 M Tris pH²⁵ = 7.5, 1mM EDTA, 0.01M β -mercaptoéthanol) ont fourni un profil montrant deux régions d'activité enzymatique : un pic étroit de bas poids moléculaire et un pic large d'environ 40 à 50 S. Ce profil correspond à celui obtenu par Weissmann et coll. (243) dans des conditions presque similaires. Aucune fraction n'a montré de dépendance à l'addition d'ARN viral. Le rendement en activité enzymatique de cette tentative est faible : sur les 7'995 unités mises sur le gradient, seules 489 ont été récupérées, soit 6.1 %. Les très faibles rendements obtenus ont justifié l'abandon de cette méthode.

D'autres tentatives de purification par ultracentrifugation dans des gradients de glycérol ou de saccharose, avec des tampons différents, ont abouti au même type de résultats.

e) autres tentatives

Plusieurs autres méthodes ont été passées en revue; parmi celles-ci, nous noterons les systèmes à deux phases : polyéthylène glycol 6.4 % - dextrane 500 1.6 % (7, 96 , 9) qui aboutirent à une perte d'activité d'environ 80 % lors de la première partition à 2 M NH₄Cl, l'autodégradation (voir § d) et la chromatographie sur DEAE-Séphadex. Toutes montrèrent, comme les précédentes, une grande perte d'activité enzymatique sans en entraîner la restauration par l'addition d'ARN matriciel.

Bien longtemps après avoir changé d'orientation (voir plus loin) nous avons à nouveau tenté de purifier la synthétase enzymatique de R17 en suivant la méthode publiée récemment par Kamen (111) pour la réplicase de Q β . Le sommaire des résultats d'une des tentatives est donné sur la table 5; on constate que le problème majeur de la purification est l'instabilité de l'enzyme. Cette tentative nous a permis toutefois de remarquer que l'activité synthétase sort des colonnes de DEAE-cellulose et de phospho-cellulose exactement aux mêmes molarités de sels que celles où la réplicase de Q β en est éluée et que le profil de sédimentation obtenu dans le gradient de glycérol en haut sel est identique à celui de R. Kamen. L'activité enzymatique, par contre, est, à ce stade, tant sur poly-C que sur l'ARN viral, réduite à néant.

On peut donc estimer que les enzymes de Q β et de R17 sont, en ce qui concerne leurs propriétés ioniques et peut-être leur structure, très semblables mais que l'activité R17 synthétase comme celle de f2 d'ailleurs (voir § suivant), se distingue par sa haute instabilité.

Table 5 : tentative de purification de l'ARN synthétase de R17 en suivant la méthode décrite par Kamen (111)
pour la réplicase de Q β

Un extrait brut (S26RIE infecté 25 minutes par R17amB2) préparé comme décrit par Kamen (111) a été utilisé pour suivre exactement la méthode de purification de la réplicase de Q β publiée par cet auteur. Les étapes de purification sont :

- 1) Partition en phases de polyéthylène glycol 6.4 % - Dextrane 500 1.6 %
- 2) Chromatographie sur DEAE cellulose
- 3) Chromatographie sur phospho-cellulose (PC)
- 4) Gradient de glycérol

Les résultats de Kamen pour la réplicase de Q β sont ceux publiés avec sa méthode (111).

Table 5

Etapas	Protéines mgr	Activité enzymatique unités a)	Activité spécifique unités/mgr	Rendement %	Résultats de R. Kamen	
					Activité spécifique unités/mgr	Rendement %
Extrait brut	2'500	6'174	2.5	100	10.5	100
Après les phases	b)	1'187	b)	19	b)	131
Après chromato sur DEAE	1'980	624	0.32	10	126	89
Après chromato sur PC	114	37.7	0.33	0.6	1'080	78
Après gradient de glycérol	3 c)	inactif d)	-	-	2'770	32

- a) mesurée en mmoles GMP incorporées en 10 minutes à 30°C
b) le polyéthylène glycol présent dans ces fractions empêche le dosage des protéines
c) estimation
d) aussi bien en présence de poly C (75 µgr/dosage) qu'en présence d'ARN viral (45.5 µgr/dosage)

f) conclusions

Nos essais de purification de la synthétase de R17 se sont tous heurtés à un échec dû très vraisemblablement à la forte instabilité que montre l'enzyme dès qu'elle a quitté les conditions d'extrait brut. L'enzyme est stable en extrait brut mais tous les fractionnements tentés ont abouti à son inactivation; il semble donc que la purification de la synthétase de R17 reste un problème techniquement très difficile.

Il est peut-être utile de signaler ici que des tentatives entreprises par d'autres auteurs se sont également soldées par des échecs du même genre : c'est ainsi que J. Kirchbaum, du laboratoire de J. Watson à Harvard University et Paul Kaesberg à l'Université du Wisconsin nous ont récemment signalé avoir abandonné la purification de la synthétase de R17 à la suite également de problèmes quasi insurmontables de stabilité. Fedoroff et Zinder toutefois (56) sont parvenus en 1971 à purifier la réplicase de f2 mais leur enzyme a perdu, en fin de purification, toute spécificité pour l'ARN de f2 et ne répond qu'à l'addition de poly-C. Sa durée de demi-vie, par ailleurs n'est que de 12 heures à 0°C.

La réplicase de Q β par contre est stable et a été purifiée complètement d'une part par R. Kamen (110) et d'autre part par Kondo et coll. (122). Il peut paraître étonnant qu'une telle différence distingue l'enzyme de Q β et celle des virus à ARN de groupe I; il se pourrait par exemple qu'une différence d'affinité entre les sous-unités composant le complexe enzymatique actif soit à l'origine de cette différence.

Chapitre 4

ETUDES DE QUELQUES PROPRIETES DE LA "SYNTHETASE CISTRONIQUE"

SYNTHETISEE IN VITRO ET IN VIVO

a) Introduction

La purification de l'ARN synthétase enzymatique s'étant avérée impossible, on s'est intéressé à la purification de l'ARN synthétase cistronique */; en effet deux des buts décrits dans l'Introduction de cette thèse étaient encore atteignables par l'étude de la synthétase cistronique : la détermination de son poids moléculaire et celle de ses acides aminés terminaux; ces informations auraient permis aux chercheurs établissant les séquences de nucléotides de l'ARN viral

(1) d'estimer les longueurs des séquences non traduites (36) et

(2) de savoir où, dans la séquence 3'OH terminale de l'ARN, se situe, parmi les codons terminateurs possibles présents dans cette séquence, le vrai codon terminateur de la synthétase cistronique.

Le schéma de purification que nous avons adopté est le suivant : synthétiser in vivo ou in vitro de la synthétase cistronique en présence d'acides aminés radioactifs, la purifier jusqu'à l'obtention d'une préparation radioactivement homogène, ajouter alors une bonne quantité de ce marqueur à un lysat de cellules infectées puis purifier la radioactivité jusqu'à l'obtention d'une seule bande polypeptidique sur gel de polyacrylamide.

On se souvient que la protéine capsidiaire ne contient pas d'histidine (238, 237); en utilisant cet acide aminé marqué dans un système d'incorporation in vitro ou dans une bactérie histidine⁻, on peut donc, "radioactivement" parlant, éliminer la protéine capsidiaire qui est le majeur produit de synthèse dans les deux cas.

Nous avons d'abord exploré les possibilités des systèmes d'incorporation in vitro (165, 162) en suivant la méthode de

*/ pour la distinction entre synthétase enzymatique et synthétase cistronique, voir la fin de l'Introduction de cette thèse.

synthèse des protéines de Salzer et coll. (191) et en analysant les produits sur gradients de saccharose comme décrit par Capecchi (27). Nous avons ainsi décrit quelques caractéristiques intéressantes qui sont apparues lors d'analyses sur gradients, mais, la synthèse in vitro de synthétase ne nous permet pas de préparer des quantités suffisantes de marqueur radioactif. Nous avons alors tenté de l'obtenir in vivo dans des bactéries infectées par le phage. L'emploi de cette méthode toutefois comporte une difficulté majeure du fait que R17 ne ralentit, après l'infection, que très modérément la synthèse des protéines bactériennes : Sugiyama et Stone (221) ont montré, par l'incorporation d'histidine marquée, que les cellules infectées avec MS2 présentent sur gels de polyacrylamide une bonne douzaine de pics de protéines, alors que deux seulement sont codées par le phage. Si donc on veut marquer in vivo la synthétase cistronique, il faut réduire au minimum la synthèse des protéines bactériennes.

Les travaux qui, préalablement, avaient été entrepris dans ce sens, font usage de deux antibiotiques :

a) la rifampicine (81) qui inhibe sélectivement la RNA polymérase de l'hôte (241); on savait que les phages à ARN se développent normalement dans des cellules résistantes à cet antibiotique (149), et, d'après Fromageot et Zinder (64), que la rifampicine n'affecte nullement la répllication de f2 dans des cellules sensibles à condition qu'elle soit ajoutée, au plus tôt, 4 minutes après l'infection; et

b) l'actinomycine D (163, 170, 146) qui bloque physiquement la RNA polymérase de l'hôte sur l'ADN.

Si on admet le modèle généralement accepté pour le cycle répllicatif des phages à ARN, ce dernier ne devrait pas être affecté par ces antibiotiques. Or, au cours de nos travaux, nous avons constaté que, contrairement à ce qui avait été publié pour la rifampicine (64) et f2, ces deux antibiotiques ne permettent pas la production de phages. Cette constatation nous incita à étudier plus à fond cette inhibition; ce sont les résultats de ces études, présentées dans la deuxième partie de notre thèse, qui nous ont conduit à la description d'un état intéressant de relation entre le phage et la bactérie-hôte.

b) Synthèse *in vitro* de synthétase cistronique

Sachant que la protéine d'assemblage n'est synthétisée *in vitro* qu'en quantités minimales (27, 139) et que, par ailleurs, la protéine capsidiale ne contient pas d'histidine (237), on peut estimer que l'incorporation de cet acide aminé dans un système *in vitro* de synthèse des protéines programmé par l'ARN de R17 représente une bonne mesure de la synthèse du produit du cistron C.

La figure 9A montre, jusqu'aux tétrasomes, le profil de sédimentation en gradient de saccharose du matériel synthétisé *in vitro* en présence d'histidine marquée. On constate que la radioactivité suit le profil de densité optique à 260 m μ du fond du gradient jusqu'aux monosomes. Dans les fractions légères apparaissent deux pics de radioactivité sans rapport avec la D.O. à 260 m μ : un pic d'environ 45 S et un pic d'environ 20 à 35 S.

Afin d'étudier les fractions légères, la même analyse fut reprise en centrifugeant les ribosomes suffisamment pour que les particules 70 S sédimentent juste avant le fond du gradient. On constate sur la figure 9B que le matériel synthétisé se répartit en quatre pics qui sont à partir du fond du gradient :

- un pic 70 S, déjà rencontré sur la figure 9A, associé à la D.O. des monosomes,
- une épaule d'environ 45 S (fréquemment constatée mais dont la hauteur est très variable d'une expérience à l'autre),
- un pic d'environ 35 S,
- et finalement un pic 20 S déjà décrit par Capecchi (27).

L'élément nouveau et très reproductible de ce type de profil est le pic 35 S. Capecchi avait montré (27) qu'un pic 35 S se forme si on utilise un autre acide aminé que l'histidine dans un système de synthèse *in vitro* et que ce pic est très sensible à la RNase pancréatique; il avait également démontré, au moyen de l'ARN du mutant R17amB2, que le matériel radioactif constituant ce pic est de la protéine capsidiale. Il devenait très intéressant de voir si notre pic 35 S marqué à l'histidine était lui aussi très sensible à la RNase pancréatique; dans ce cas, cela signifierait qu'il est composé d'une protéine contenant de l'histidine peut-être liée à de l'ARN viral.

La fraction contenant le maximum de radioactivité d'un pic 35 S fut divisée en deux lots dont l'un fut traité à la RNase pancréatique comme décrit par Capecchi (27). Les deux lots furent ensuite analysés sur des gradients parallèles de saccharose. La figure 10 montre que le pic 35 S est détruit par des quantités infimes de RNase et qu'environ 35 % de sa radioactivité (après

déduction du bruit de fond) sédimente en un pic plus léger. Comme environ la moitié des C.P.M. sont perdus lors de cette opération, il se pourrait qu'une fois séparé de l'ARN le matériel radioactif précipite ou soit adsorbé sur les parois du tube.

Afin de déterminer la protéine responsable de ce pic, nous en avons analysé le matériel, après l'avoir concentré, par électrophorèse en gel de polyacrylamide (figure 11). On constate que le matériel marqué à l'histidine du pic 35 S se compose d'une seule protéine et non pas d'aggrégat de protéines non terminées. Son P.M. (voir § d), identique à celui du produit du pic 20 S (voir figure 13B) (identifié par Capecchi comme étant de la synthétase), nous permet de penser que cette protéine est de la synthétase cistronique.

Les synthèses in vitro de protéines, avec marquage à l'histidine, produisent donc de la synthétase cistronique radioactivement presque pure */. Toutefois, elles ne nous permirent guère d'envisager la préparation de marqueurs radioactifs en très grandes quantités : il aurait en effet fallu plusieurs dizaines de mCi d'histidine marquée pour préparer 5 à 10×10^6 CPM de synthétase, quantité que l'on pourrait considérer comme juste suffisante pour suivre une seule expérience de purification de la synthétase cistronique. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné au sujet de la figure 10, nous avons rencontré des problèmes de solubilité ou d'adsorption (voir aussi plus loin) qui nous auraient contraint à ne travailler qu'en présence de SDS.

Pour ces raisons, nous avons exploré les possibilités des systèmes in vivo de cellules infectées et traitées à la rifampicine ou l'actinomycine.

c) synthèse in vivo de synthétase cistronique

Le but de cette série d'expériences était de déterminer si un système in vivo - consistant en une cellule infectée traitée avec un antibiotique ayant pour effet de diminuer, et si possible d'abolir, sa synthèse en ARN messager - permettait d'obtenir quantitativement parlant de meilleurs résultats que dans les systèmes in vitro.

Nous ne reporterons ici qu'un seul exemple (figure 12A) des tentatives consistant à traiter, conformément à Fromageot et Zinder (64), une cellule infectée à la rifampicine, à en extraire les protéines et à en comparer, sur gels de polyacrylamide-SDS, le profil radioactif avec celui de protéines extraites d'une cellule non in-

*/ Notons que Jockusch et coll. (107) ont décrit, dans des systèmes in vitro programmés avec l'ARN de Q β , un pic 30 S de matériel également marqué à l'histidine et très sensible à la RNase. Il s'agit donc très probablement aussi de synthétase cistronique, de Q β cette fois.

fectée. Les protéines caractéristiques du phage sont clairement visibles sur la figure 12A*/ mais on remarque qu'elles sont accompagnées d'autres protéines que l'on retrouve dans les cellules non infectées (une remarque similaire a été faite par Phillips et coll. (179)). On constate par ailleurs que sur le plan quantitatif **/ comme sur le plan qualitatif, les résultats ne permettent guère de penser que cette méthode puisse fournir le marqueur désiré (voir introduction de chapitre). Les expériences entreprises avec de plus fortes concentrations de rifampicine n'ont pas donné de meilleurs résultats.

Nous avons en outre essayé de traiter les cellules avant l'infection avec de l'actinomycine D (88, 105, 170, 127, 206, 207) en suivant la méthode décrite par Oeschger et Nathans (170) et en utilisant la même cellule, C3000 Hfr, qu'eux (en effet les conditions de sensibilisation des cellules à l'actinomycine, nécessaire à la pénétration de l'antibiotique dans la cellule, varient fortement d'une souche à l'autre).

Les résultats d'une telle expérience, ainsi que la cinétique d'incorporation, sont indiqués dans la figure 12B : les trois protéines phagiques sont clairement séparées et un seul pic de matériel bactérien apparaît (il serait intéressant de connaître l'élément dont la synthèse est ainsi résistante à l'actinomycine).

Nous avons alors tenté de séparer les protéines marquées synthétisées lors de cette expérience par filtration moléculaire à travers du P-300 en présence de 1% de SDS. Cette chromatographie qui a, par ailleurs, servi, parmi d'autres, à déterminer le P.M. de la synthétase cistronique (voir § d ci-après) est présentée dans le paragraphe suivant (figure 14B). Bien que le rendement général

*/ si K225 est infectée avec le mutant R17amA7 (mutation dans la protéine d'assemblage), le deuxième pic de matériel phagique disparaît. Ce pic par exemple représente bien de la protéine d'assemblage.

**/ on peut en effet calculer à partir des données de la figure 12A que le rendement du système in vivo est d'environ 10^3 CPM par μCi d'histidine- H^3 ajouté, donc guère supérieur à celui des systèmes in vitro.

de cette opération soit assez satisfaisant (charge de la colonne : 150'000 CPM, récupérés : 111'400 soit 75 %), celui en synthétase est faible */.

L'emploi du SDS n'étant guère judicieux lors de purification (impossibilité de faire des chromatographies sur échangeurs d'ions, difficultés d'élimination, etc...), nous avons tenté la même expérience en utilisant 8 M urée en lieu et place du SDS avec pour résultat la perte totale de la radioactivité de la synthétase.

d) détermination du poids moléculaire de la synthétase cistronique

La purification de la synthétase ayant été rendue difficile pour des raisons déjà énoncées, les résultats présentés dans les paragraphes précédents nous ont permis de déterminer le P.M. de la synthétase cistronique. Ce paramètre important n'avait pas été établi précédemment et seul Capecchi avait donné une limite inférieure pour le P.M. de la synthétase de R17 (27).

Le P.M. de la synthétase de R17 a été déterminé par deux méthodes différentes, les électrophorèses en gels de polyacrylamide-SDS et la filtration moléculaire, au moyen de matériel synthétisé in vivo et in vitro déjà présenté dans les figures 9B et 12B. Les gels contenaient des marqueurs internes dont la liste, les mobilités électrophorétiques et les P.M. respectifs sont indiqués sur la figure 13 et sa légende. Les colonnes de P-300 ont d'abord été calibrées (calibration sur la figure 14A **/) puis le matériel radioactif (déjà présenté dans la figure 12B) chromatographié (profil d'élution dans la figure 14B).

Les valeurs de P.M. obtenues avec du matériel synthétisé in vitro étant identiques à celles fournies par du matériel synthétisé in vivo, les résultats généraux de ces déterminations sont les suivants (moyennes de 10 gels et de deux chromatographies) :

*/ on peut en effet calculer, à partir de la figure 12B, que 14 % de la radioactivité représente de la synthétase; parmi donc les 150'000 CPM chargés sur la colonne de P-300, 21'000 étaient de la synthétase. L'intégration du pic de synthétase élué de la colonne donnant 5'710 CPM, le rendement en synthétase de cette chromatographie est de 27 %.

**/ il est à noter que la courbe de calibration de P-300 dans 1 % SDS n'est pas linéaire. Nous avons plusieurs fois observé cette particularité et n'en connaissons pas l'origine. Les valeurs obtenues sont néanmoins tout à fait reproductibles.

P.M. de la synthétase cistronique : $63'000 \pm 2'000$
(valeurs extrêmes : $\overline{61'000}$ et $65'250$)

A titre de comparaison, nous donnons ci-dessous les valeurs de P.M. obtenues par la même occasion pour la protéine d'assemblage :

P.M. de la protéine d'assemblage : $40'000 \pm 2'000$
(valeurs extrêmes : $38'400$ et $42'000$)

Ce résultat est en parfait accord avec des valeurs publiées précédemment (5, 171).

Nous avons par ailleurs constaté, tant sur gels que lors de chromatographies sur P-300, que la protéine capsidiale montre un comportement anormal : elle migre à une situation correspondant à un P.M. nettement plus bas que le sien ($13'750$, calculé d'après (238)). Nous avons constaté sur gels de polyacrylamide, en comparant sa mobilité électrophorétique à celle de la RNase A (P.M. = $13'700$ (205)) et à la RNase S (P.M. = $11'400$ (180)), qu'elle ne migre à une position correspondant à son poids moléculaire que dans des gels contenant 15 % d'acrylamide.

DISCUSSION

L'objectif poursuivi dans cette première partie de notre thèse était la purification de l'ARN synthétase de R17. Nous avons vu dans la section consacrée aux résultats que cette purification s'est avérée dans nos mains techniquement impossible, l'activité enzymatique devenant très instable dès qu'elle quitte les conditions d'extraits bruts.

Toutefois, au cours de ces études, un certain nombre d'observations intéressantes ont été faites sur la polarité, la détermination du P.M. de la synthétase cistronique, la présence de synthétase cistronique associée à l'ARN viral lors des synthèses in vitro de protéines et l'action des antibiotiques rifampicine et actinomycine.

1.- La polarité : nous en avons décrit le principe au début du chapitre premier. Les résultats auxquels nous sommes parvenus s'avèrent en parfait accord avec le modèle généralement admis à ce sujet et confirment les résultats obtenus in vitro par Capecchi (27) et in vivo par Gussin (78). L'emploi de mutants nous a permis d'étendre les observations faites in vivo à d'autres cas; ceux-ci n'ont, du moins à notre connaissance, pas été examinés in vitro (sauf pour R17amB11 en condition su^- (27)) et il nous paraît difficile de prolonger un parallèle entre expériences in vivo et in vitro. Toutefois le modèle que l'on peut construire à partir des expériences de liaison des ribosomes et de synthèses in vitro de protéines semblent être en accord avec les résultats de nos expériences in vivo. Nous avons en outre constaté dans une expérience non décrite ici que l'incorporation d'histidine dans le système surproducteur C600GF⁺/λ + R17amB2 en présence de rifampicine est de 4 à 5 fois supérieure que lorsque la même cellule est infectée avec le phage sauvage. Malgré ses limitations (incorporation d'histidine dans la protéine d'assemblage), ce résultat semble montrer que la surproduction de synthétase est l'effet d'une synthèse accrue de matériel et non la conséquence d'une quelconque perturbation métabolique consécutive à l'infection. Selon toute vraisemblance, la polarité in vivo comme in vitro ne correspond donc qu'à un seul et même mécanisme.

2.- Le P.M. de la synthétase cistronique n'avait pas encore été déterminé; seul, Capecchi (27) en avait donné une valeur minimale pour la protéine synthétisée in vitro. La valeur que nous avons trouvée, obtenue tant in vivo que in vitro, par l'emploi de deux méthodes indépendantes, a permis à Cory et coll. (36) de déterminer la grandeur des séquences non traduites de l'ARN viral.

3.- Le pic 35S de matériel marqué à l'histidine des analyses sur gradient, est donc très probablement de la synthétase faite in vitro et associée à l'ARN viral. Comme nous l'avons déjà signalé, la plupart de ces données furent, dans l'entre-temps, publiées par Jockusch et coll. (107) pour Q β . Il faut remarquer à ce sujet que Capecchi (27), dont nous suivions fidèlement la méthode, n'avait apparemment pas remarqué ce fort pic 35 S de matériel marqué à l'histidine. Il se pourrait que cela soit dû au fait qu'il préparait ses extraits S-30, pour la synthèse in vitro des protéines, avec la bactérie S26 qui est RNase I⁺ (208) - nous l'avons testée - alors que Jockusch et coll. utilisent Q13 et nous-même D-10 qui sont toutes les deux RNase I⁻.

4.- L'actinomycine et la rifampicine in vivo, bien qu'ayant finalement fourni de bons profils (figure 12B), ne nous ont, en soi, pas apporté d'éléments nouveaux quant à la synthétase cistronique. Elles nous ont toutefois mis sur une piste à laquelle nous avons déjà fait allusion et à laquelle nous consacrons la deuxième partie de notre thèse.

Figure 2 : synthèse in vitro de synthétase cistronique

A 700 μ l d'un système in vitro de synthèse des protéines programmé par l'ARN de R17 (191) et ayant incorporé de l'histidine tritiée durant 25 minutes à 37°C, on ajoute 470 μ l d'eau distillée. Le tout est ensuite déposé à la surface d'un gradient de saccharose (60 ml), pour le rotor SW 25.2 de Spinco, formé dans le tampon de centrifugation décrit par Capecchi (27). Après la centrifugation (voir ci-dessous), 30 fractions de 2 ml sont collectées. Elles servent à mesurer la densité optique à 260 m μ ainsi que la radioactivité précipitable à chaud au TCA (filtration et lavage sur filtres de verres GF/C, comptage dans le liquide scintillant à base de toluène). Les fonds des gradients sont à gauche.

A : centrifugation pendant 5 heures à 25'000 TPM et à 0°C

B : centrifugation pendant 13 heures à 20'000 TPM et à 0°C

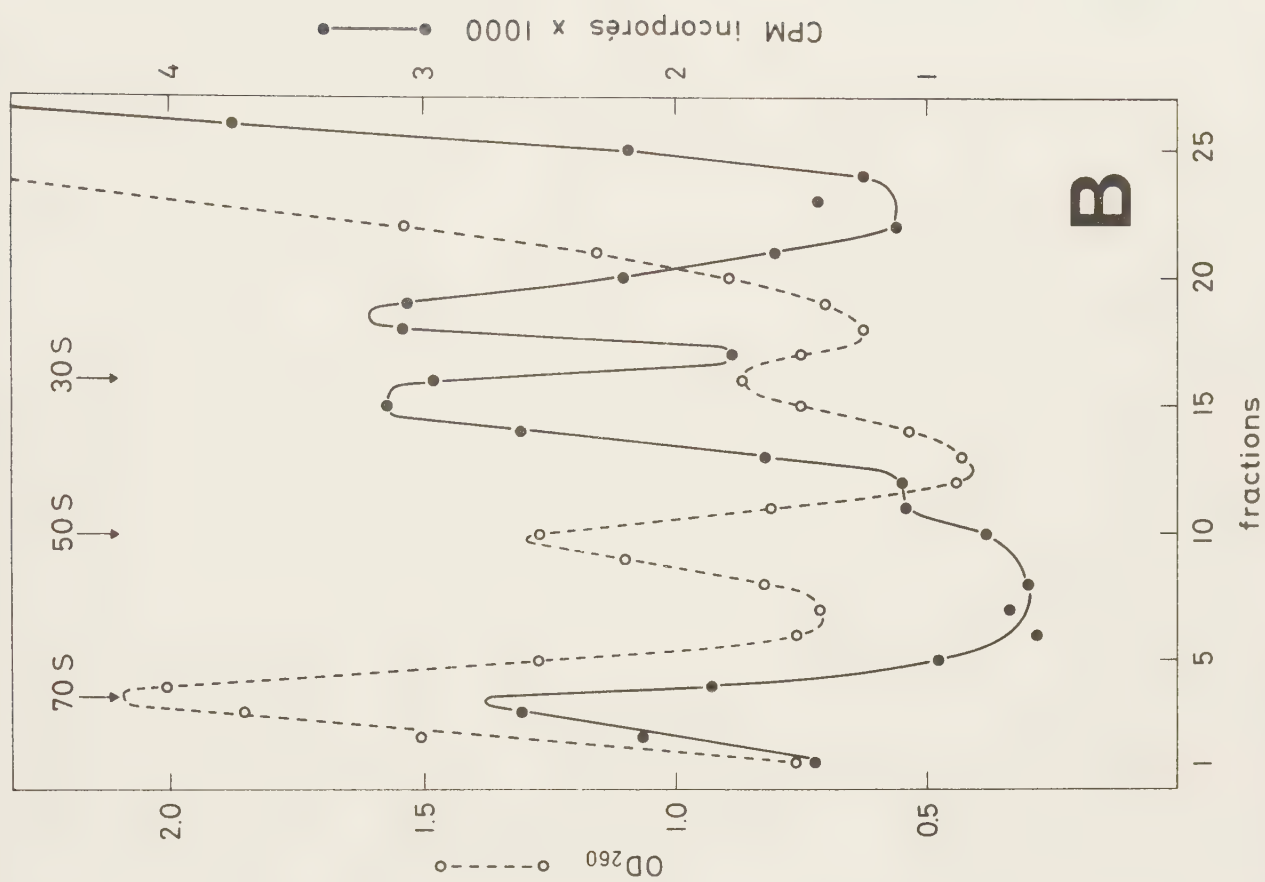
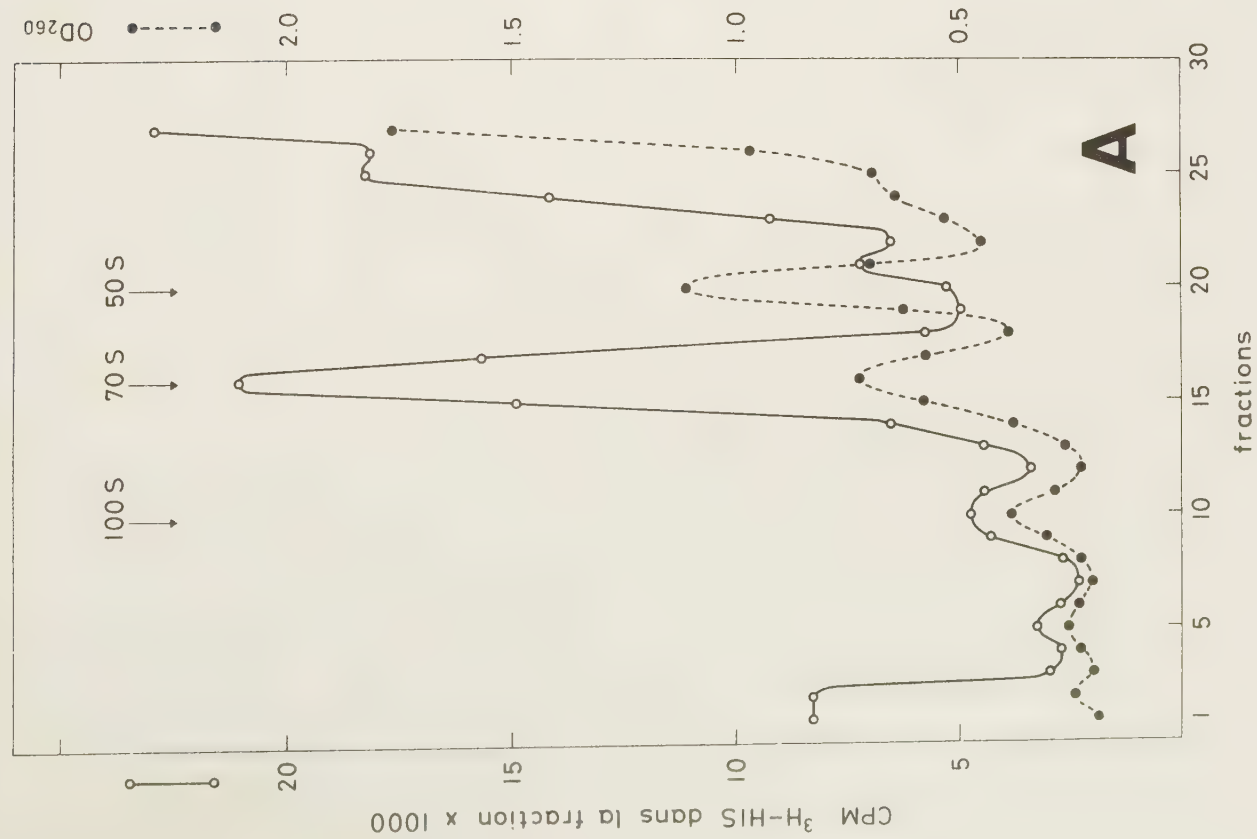


fig. 9

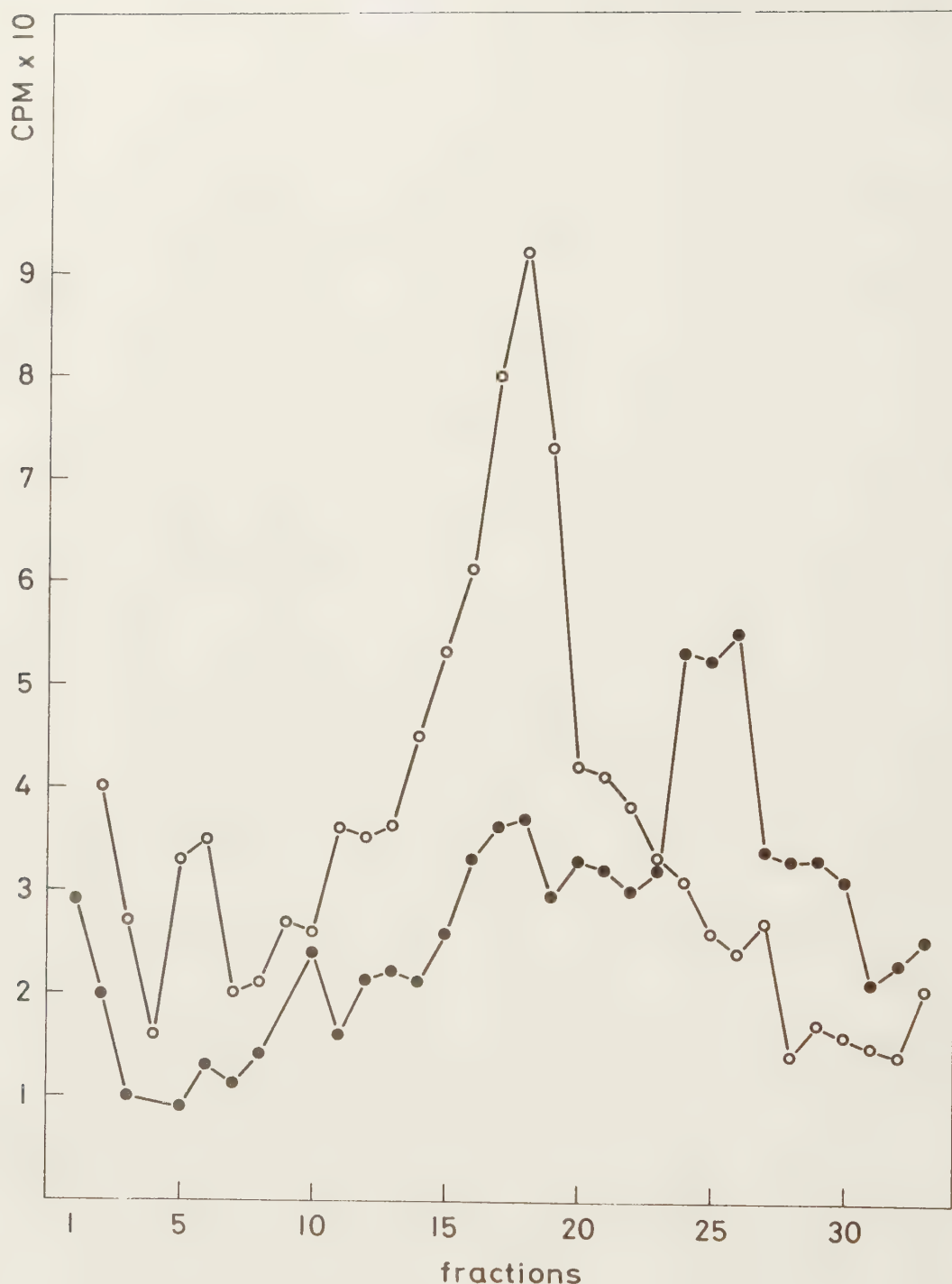


Figure 10 : sensibilité à la RNase du pic 35 S

100 μ l de la fraction 14 du gradient présenté à la figure 9B sont traités avec 0.05 μ gr de RNase pancréatique pendant 5 min. à 0°C puis analysés, avec un témoin non traité, par centrifugation à travers un gradient de saccharose 5 à 20 % selon Capecchi () pendant 2 h 15 à 50'000 TPM et à 0°C dans le rotor SW65 de Spinco. 33 fractions sont collectées, précipitées au TCA chaud, filtrées et comptées comme précédemment.

○—○ témoin non traité ●—● échantillon traité

Le fond du gradient est à gauche.



Figure 11 : analyse en gel de polyacrylamide-SDS du pic 35 S

100 μ l de matériel provenant du pic 35 S (fraction 15 de la figure 9B) ont été traités exactement comme décrit dans la légende de la figure 13B et soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Figure 12 : analyse en gels de polyacrylamide du produit de synthèse in vivo en présence d'antibiotiques

A : synthèse en présence de rifampicine : des cellules K 225 ayant crû dans le milieu MTPA (230) jusqu'à une D.O. à 550 mμ = 0.2 sont sédimentées et resuspendues dans le même volume de milieu frais. Elles y sont délicatement (pilis!) agitées pendant 5 minutes environ. 30 secondes avant l'infection, on ajoute 2.5 μl de CaCl₂ par ml de culture. Les cellules sont ensuite infectées (multiplicité entre 50 et 100). 5 minutes après l'infection, on ajoute 100 μgr de rifampicine / ml et 5 minutes plus tard 2.5 μCi/ml d'histidine-H₃ (45 Ci/mmole). 30 minutes après l'infection, les cellules sont rapidement refroidies et lavées une fois dans du milieu de culture. Des échantillons de 100 μl sont ensuite précipités avec 100 μl de TCA 10 %, lavés deux fois à l'acétone, resuspendus dans 250 μl de "sample buffer" (voir Matériel et Méthodes), portés à 100°C pendant 15 minutes, refroidis, centrifugés pour éliminer les débris non dissouts par le SDS et soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 % (voir légende de la figure 13B). Seules les 30 premières fractions sont indiquées.

○- - - ○ cellules non infectées; ●- - - ● cellules infectées; S : position de la synthétase dans un gel parallèle contenant des marqueurs; A : idem pour la protéine d'assemblage.

B : synthèse en présence d'actinomycine : une culture de C3000Hfr est traitée exactement comme décrit par Oeschger et Nathans (170) sauf que l'actinomycine est ajoutée à 14.4 μgr/ml 8 minutes avant l'infection. Le marquage a été effectué au moyen d'un lysat de protéines d'algues marquées au C-14 (54 mCi/m², 0.25 μCi/ml de culture). Les protéines ont ensuite été extraites au phénol comme décrit par Ward et coll. (235), précipitées à l'acétone contenant 0.1 M d'acide acétique, lavées à l'éther, séchées, redissoutes dans du "sample buffer" (voir Matériel et Méthodes) et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (voir légende de la figure 13B). Le cartouche en haut à gauche donne, en fonction du temps (minutes), la cinétique d'incorporation des acides aminés dans les cellules. S, A et PC indiquent respectivement la synthétase cistronique, la protéine d'assemblage et la protéine capsidiaire.

- - - - - cellules non infectées ●- - - ● cellules infectées

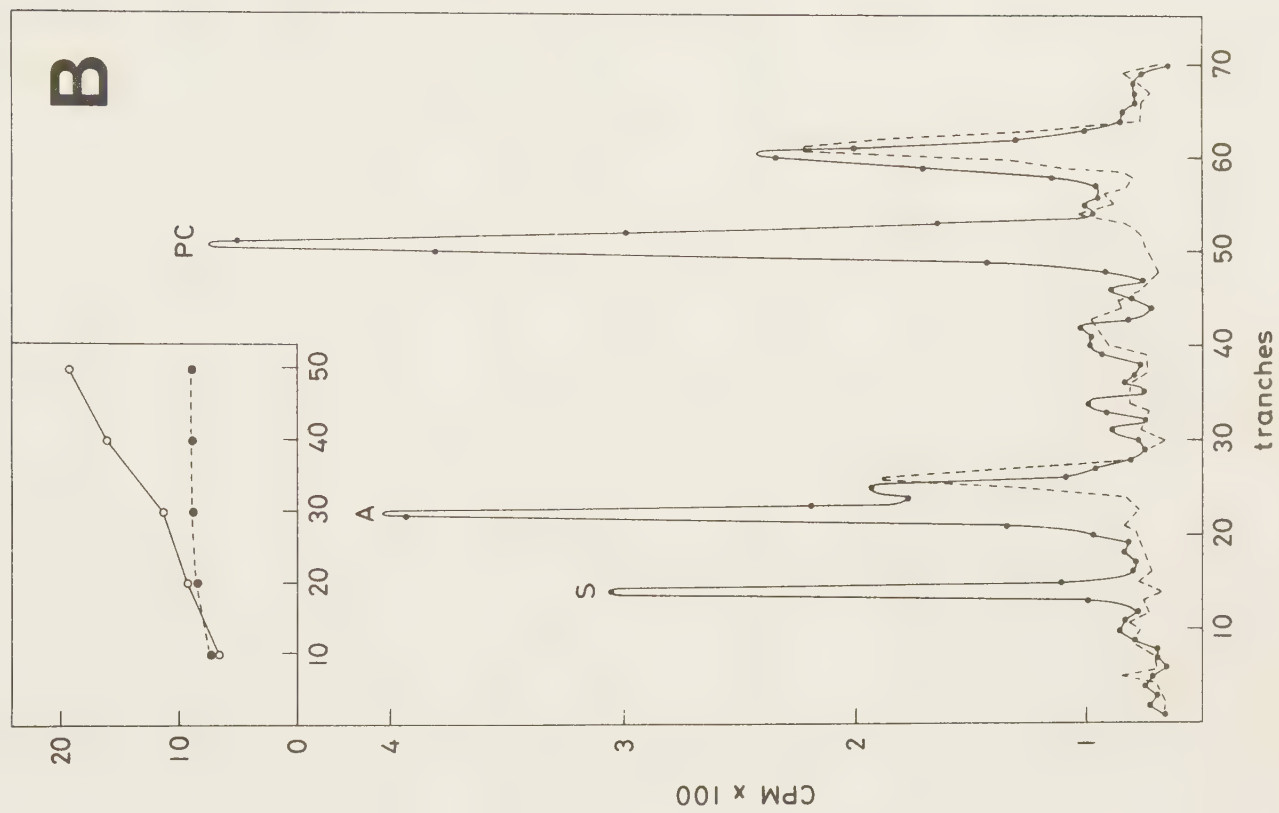
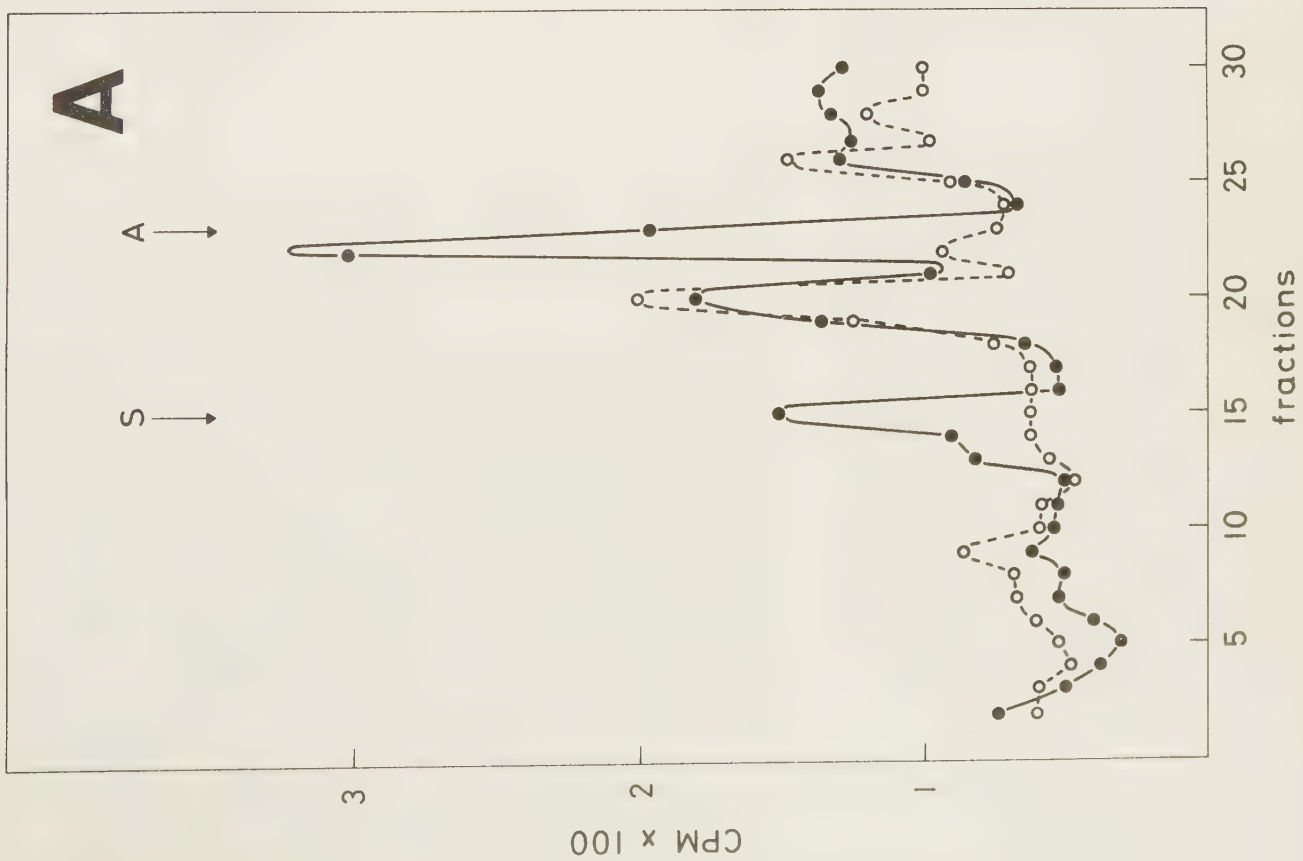


fig 12

Figure 13 : détermination du poids moléculaire de la synthétase cistronique par électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de 0.1 % de SDS

A : calibration des gels : un mélange des marqueurs sous mentionnés (dans le "sample buffer", voir Matériel et Méthodes) sont soumis à l'électrophorèse. Les gels sont ensuite colorés au bleu brillant de Coomassie, décolorés et les distances migrées par les marqueurs mesurées (239).

Marqueurs : PA : phosphorylase A , P.M. = 98'000 . BSA : albumine de sérum de bovin , P.M. = 68'000 . PK : pyruvate kinase , P.M. = 57'000 . O : ovalbumine , P.M. = 43'000 . P : pepsine , P.M. = 35'500 . CA : anhydrase carbonique , P.M. = 29'000 . C : chymotrypsinogène , P.M. = 25'700 . M : myoglobine , P.M. = 17'800 (43) . RA : RNase A , P.M. = 13'700 (205) . RS : RNase S , P.M. = 11'400 (180) . I : insuline , P.M. = 5'800 . Les valeurs de P.M. sont tirées de Weber et Osborn (239) sauf pour M, RA et RS.

B : 100 µl de matériel marqué à l'histidine provenant du pic 20 S (fraction 18 de la figure 9B) représentant environ 5'000 CPM sont incubés avec 6 µgr de RNase pancréatique pendant 10 minutes à 37°C. On ajoute alors 0.6 ml de TCA 10 % et laisse précipiter à la glace pendant 10 minutes. L'échantillon est alors centrifugé 10 minutes à 10'000 TPM à la Sorvall (rotor SS-34) et le sédiment lavé deux fois à l'acétone. Il est ensuite séché pendant une heure dans un dessiccateur et repris dans 100 µl de "sample buffer" (voir Mat. et Méthodes). Après addition de 1 µl de bleu de bromo-phénol 0.1 %, l'échantillon est soumis à l'électrophorèse (7 V/cm) dans un gel de polyacrylamide 10 % (voir Matériel et Méthodes). Après l'électrophorèse, il est coupé en tranches de 1.2 mm. Ces dernières sont traitées à la pipéridine selon Viñuela et coll. (230) et comptées dans 15 ml de liquide scintillant selon Kinard (voir Matériel et Méthodes).

Les petites flèches en haut du graphique indiquent, dans l'ordre, la position de migration des marqueurs internes propres à cette électrophorèse et figurant dans la partie A de la figure.

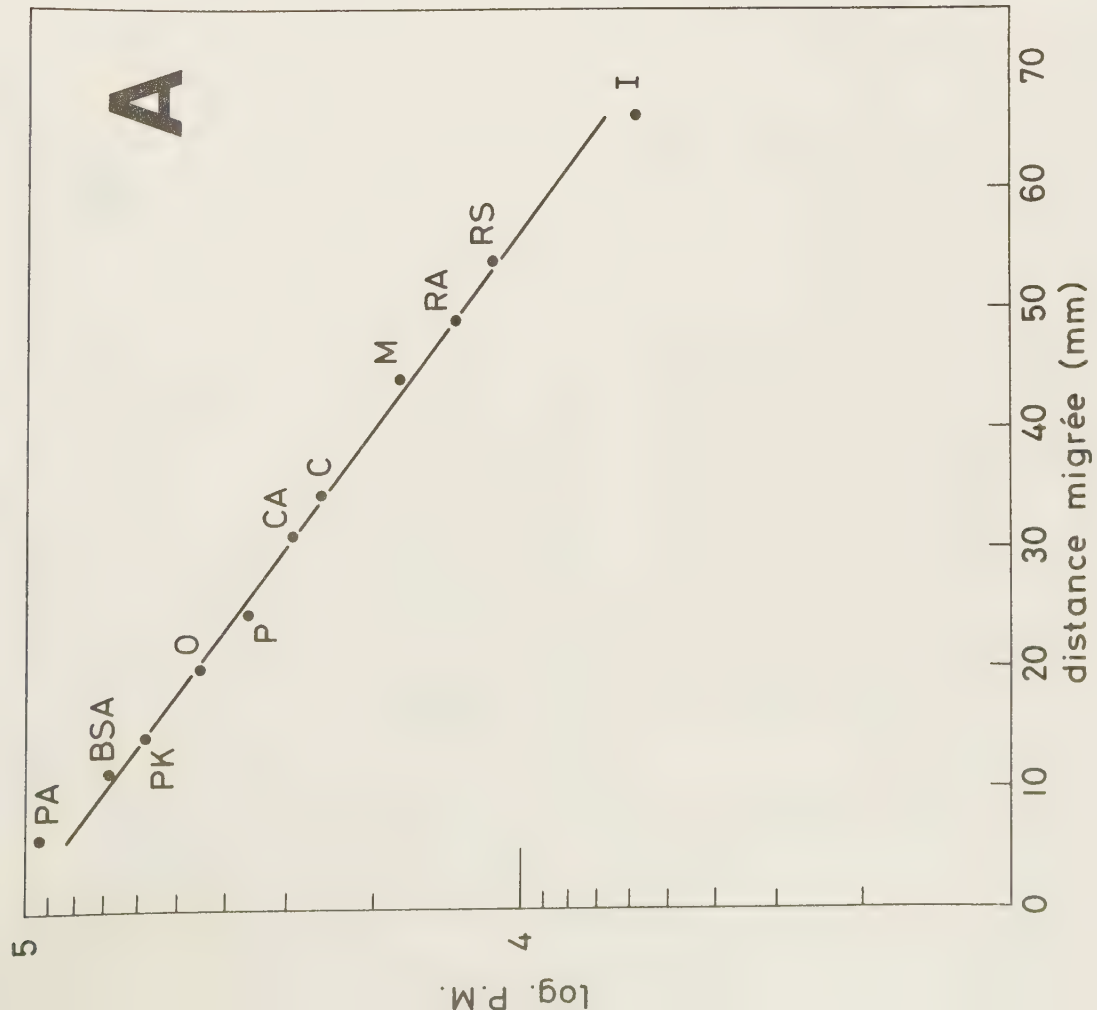
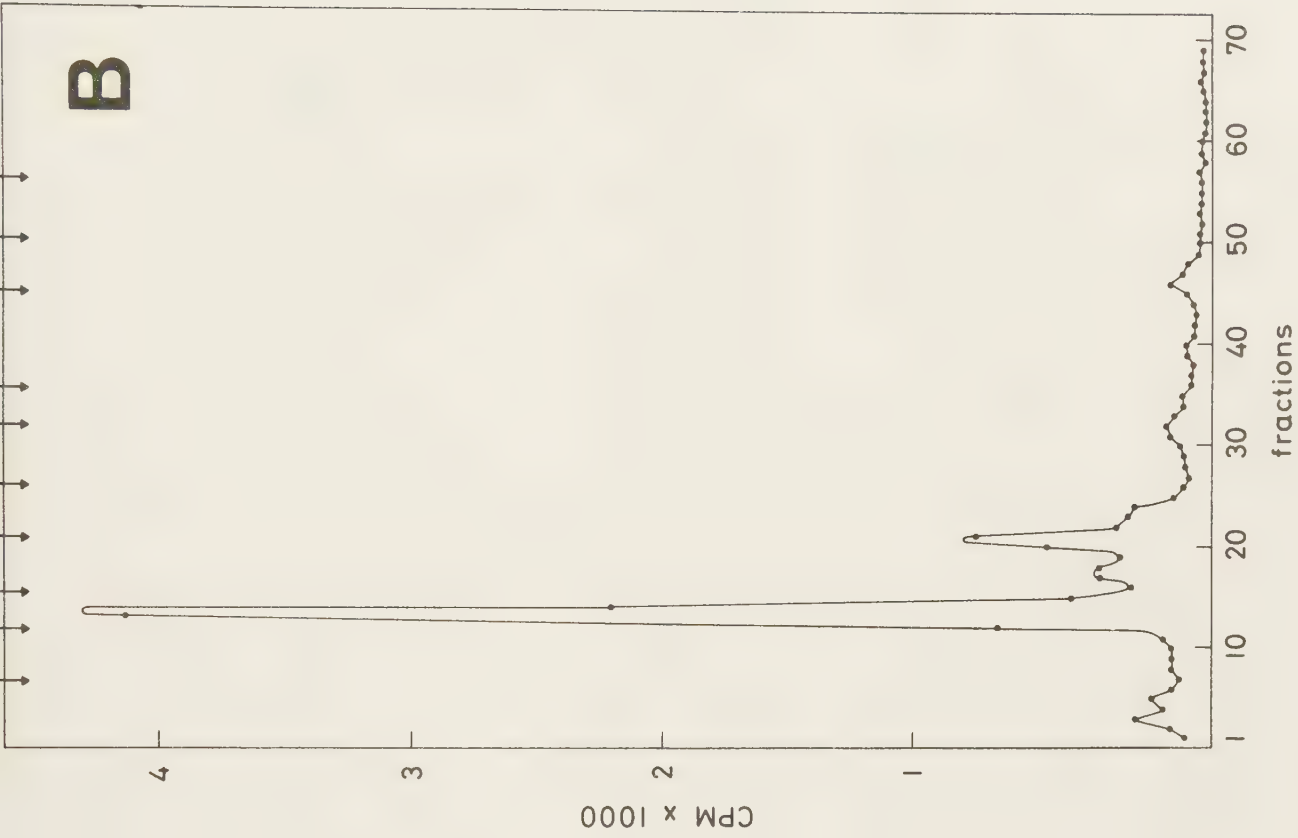


fig. 13

Figure 14 : détermination du P.M. de la synthétase cistronique par chromatographie sur P-300

A : calibration de la colonne (longueur 100 cm, $\phi = 2.5$ cm) : du P-300 gonflé dans un tampon contenant 0.1 M Na_2PO_4 pH = 7.2 et 1 % SDS selon les indications du fabricant sert à remplir la colonne. La colonne est ensuite perfusée à température ambiante pendant au moins deux jours avec le même tampon afin de la tasser normalement puis elle est calibrée par la co-chromatographie de : albumine de sérum de bovin (BSA) P.M. = 68'000 (239), d'ovalbumine (O) P.M. = 43'000 (239), de cytochrome c (Cy) P.M. = 12'384 (148) et d'uracile (U) P.M. = 112 (80). S, A et CP indiquent les fractions d'élution respectivement de la synthétase cistronique, de la protéine d'assemblage et de la protéine capsidiale dans la partie B de la figure. La flèche indique l'exclusion de la colonne (déterminée au moyen d'ARN de R17).

B : environ 150'000 CPM (500 μl) de protéines extraites au phénol de cellules infectées traitées à l'actinomycine (profil en gel de polyacrylamide-SDS présenté sur la figure 12B) sont chromatographiés sur P-300 dans le même tampon que ci-dessus. Des fractions de 1 ml sont collectées et comptées dans 10 ml de liquide scintillant selon Kinard (voir Matériel et Méthodes). E, indique l'exclusion, BSA, O et Cy les marqueurs utilisés pour calibrer la colonne (voir partie A de la figure). Le matériel recueilli était trop dilué pour permettre d'en analyser le contenu par électrophorèse en gels de polyacrylamide.

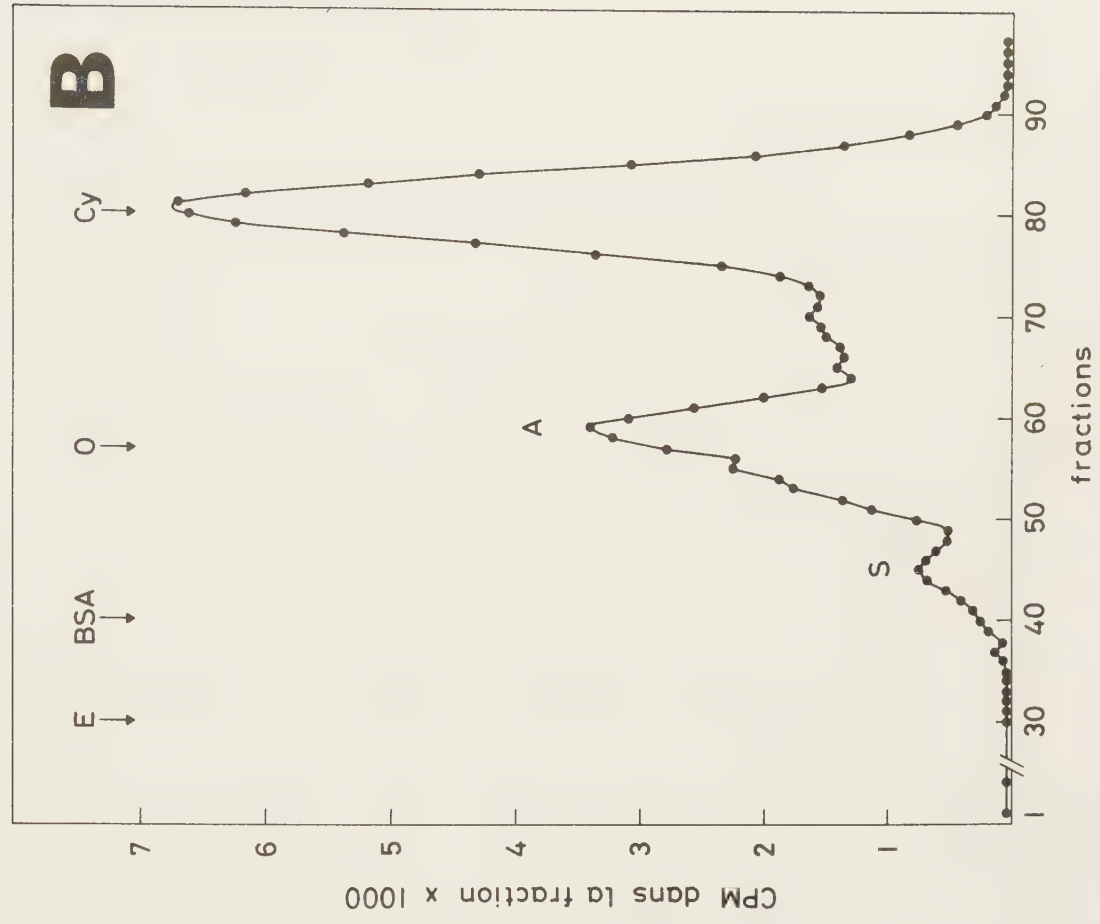
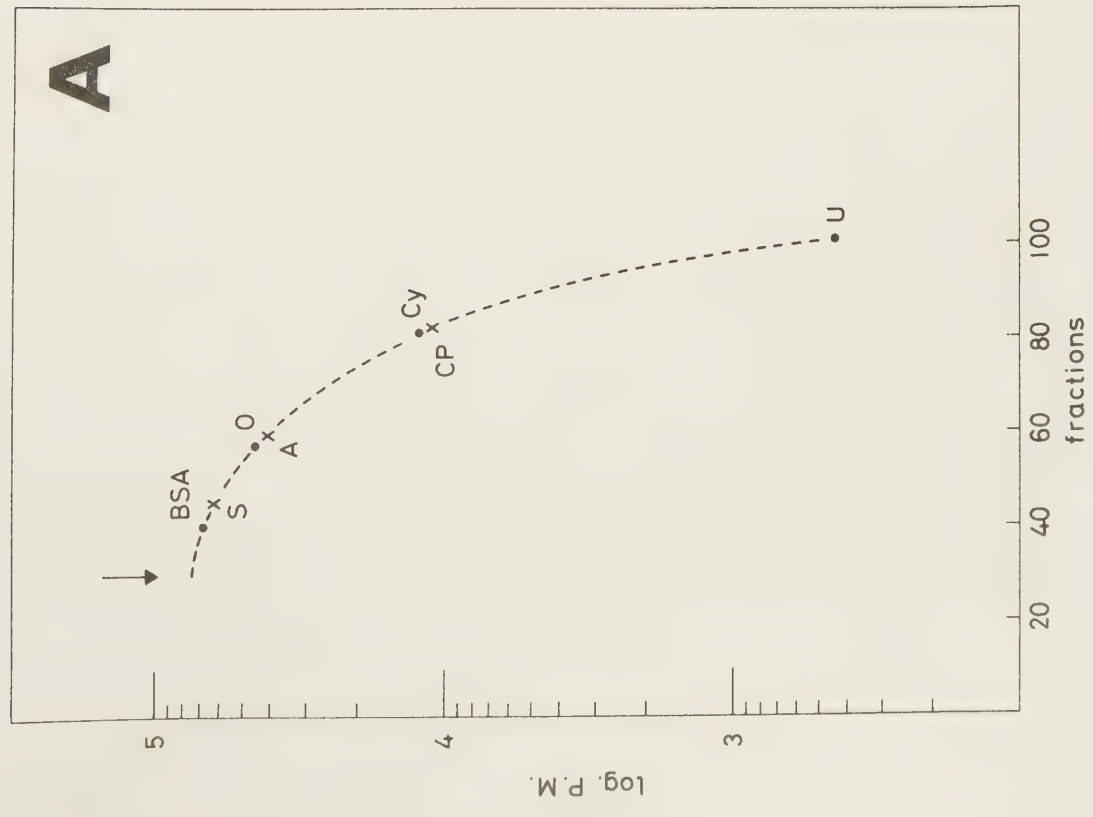


fig. 14

Deuxième partie

E T U D E S D E Q U E L Q U E S R E L A T I O N S

E N T R E R 1 7 E T L A B A C T E R I E - H O T E

INTRODUCTION

Lors des synthèses in vivo de synthétase cistronique (1ère partie, chapitre 4) nous avons utilisé la rifampicine pour inhiber la synthèse d'ARN cellulaire conformément à Fromageot et Zinder (64). Or, en répétant les expériences de ces auteurs, nous avons constaté que, contrairement à leurs résultats avec le phage f2 (très proche de R17, voir Introduction à cette thèse), la rifampicine, ajoutée 5 minutes après l'infection, abaisse très considérablement le titre de R17 produit. Cette constatation nous incita à étudier plus en détails le mécanisme de cette inhibition. L'étude de cette inhibition nous amena à examiner quelques aspects des relations pouvant exister entre la réplication des phages à ARN, la RNA polymérase et l'ADN cellulaire. Le premier chapitre de cette partie est consacré à cette étude.

Par ailleurs, les résultats obtenus nous suggérèrent une hypothèse de travail : un état de relation équilibrée peut-il exister entre le phage et son hôte ? Les expériences étudiant cette hypothèse de travail sont consignées dans le deuxième chapitre de cette partie de la thèse.

Chapitre 1

RELATIONS ENTRE LA REPLICATION DU PHAGE, L'ARN POLYMERASE BACTERIENNE

ET LE CHROMOSOME CELLULAIRE

a) Relation entre le phage et l'activité de l'ARN polymérase bactérienne

La figure 15A montre l'action sur la réplication de R17 et de MS2 de diverses concentrations de rifampicine ajoutées 5 minutes après l'infection, comme décrit par Fromageot et Zinder (64) : on constate que cet antibiotique abaisse très considérablement le titre des phages produits. Par ailleurs, nous n'avons pas seulement observé cette inhibition dans les minutes qui suivent l'infection : en effet, comme le montre la figure 15B elle se prolonge bien après elle. Récemment, d'autres auteurs ont publié des constatations analogues pour d'autres phages à ARN (107, 179, 235).

Cette action de la rifampicine n'était pas compatible avec le modèle généralement proposé (voir les revues citées dans l'Introduction de cette thèse) pour la réplication des phages à ARN et de R17 plus particulièrement dont l'ARN synthétase enzymatique est, tant in vitro (voir figure 2A) qu'in vivo (149) résistante à la rifampicine. A cela s'ajoutait une constatation faite depuis plusieurs années par Haywood et Harris (89) : l'actinomycine D provoque l'inhibition irréversible de la synthèse d'une fonction (ou d'une structure) requise pour la réplication de MS2 avant même que la synthèse d'ARN filial ne débute.

Nous concluâmes donc que le phage requiert, pour se multiplier, au moins une fonction bactérienne. En ce qui concerne l'actinomycine, nous savons, voir première partie, chapitre 4 § c), que l'absence de cette fonction n'affecte ni l'adsorption, ni la pénétration, ni qualitativement la synthèse spécifique des protéines phagiques. La rifampicine agissant différemment, il convenait d'examiner si, ajoutée avant l'infection, elle permettait la synthèse in vivo des protéines virales. Les résultats de telles expériences ont fourni par analyse sur gels de polyacrylamide des profils identiques à ceux obtenus lorsque la rifampicine est ajoutée après l'infection (voir figure 12A).

Dans les deux cas donc, l'ARN est injecté puis traduit par les ribosomes puisque les trois protéines phagiques sont synthétisées.

Il était à l'époque déjà connu que la réplicase de Q β est composée de synthétase cistronique (codée par Q β) et de 3 protéines fournies par la cellule-hôte, parmi lesquelles se trouvaient les deux composantes du premier facteur ψ de Travers (227) */. Nous vîmes là deux manières possibles d'expliquer l'action inhibitrice de l'actinomycine et de la rifampicine. D'une part, il se pouvait que la rifampicine, de même qu'elle se lie à l'ARN polymérase, se liât également à la synthétase cistronique ou à une autre composante du complexe enzymatique avant que ce dernier ne soit formé. L'enzyme serait donc sensible à l'antibiotique lors de sa constitution mais lui serait résistante une fois formée. L'autre hypothèse concerne aussi bien l'actinomycine que la rifampicine. Ces antibiotiques, en bloquant l'ARN polymérase soit en cours de transcription (actinomycine) soit au site d'initiation (rifampicine) des cistrons d'ADN ribosomique, diminueraient grandement la concentration cellulaire en facteur ψ libre (pour autant que, contrairement à σ (226), il demeure lié à l'ARN polymérase en cours de transcription) nécessaire à la formation de la synthétase enzymatique. Si l'une ou l'autre de ces deux hypothèses était exacte, on ne devrait pas constater d'incorporation d'uracile marqué dans des cellules infectées, traitées avec l'un ou l'autre des deux antibiotiques avant l'infection. La figure 16 montre l'incorporation d'uracile dans des cellules traitées à la rifampicine ou à l'actinomycine 8 minutes avant l'infection. On constate une nette activité synthétase dans ces cellules qui infirme notre hypothèse d'explication **/.

Il nous a paru ici intéressant de comparer l'action inhibitrice de l'actinomycine qui bloque physiquement le cheminement de l'ARN polymérase sur l'ADN matriciel à celle possible de la streptolydigne (31) qui, comme la rifampicine, inhibe chimiquement l'enzyme, mais en cours de transcription. Nous savons en outre que cet antibiotique n'affecte pas la réplicase de Q β (247). La table 6 montre les résultats d'une telle expérience pratiquée sur la cellule AS 19 (195). On constate là aussi que la production de phages est très nettement affectée par cet antibiotique.

Les résultats de cette première série d'expériences suggèrent que R17 - et de façon présumée l'ensemble des phages à ARN - requiert pour sa répllication que l'ARN polymérase de sa cellule-hôte soit en mesure de fonctionner.

*/ actuellement Tu et Ts (20) le troisième peptide étant le facteur d'interférence i (112, 77, 76) (voir Introduction de la thèse).

**/ Par ailleurs, Hunt et Watanabe (100) ont récemment montré que l'infection de cellules avec le phage R23 (très proche de R17) n'entraîne pas de baisse dans le taux de facteur ψ libre.

Table 6

	Antibiotique ajouté	moment d'addition	D.O. à 550 mμ a)	titre phages
non infecté	aucun	-	2.370	-
non infecté	rifampicine	-	0.467	-
non infecté	streptolyd.	-	0.549	-
infecté	aucun	-	0.135 b)	5.3×10^{11}
infecté	streptolyd.	infection	0.479	5.3×10^8
infecté	streptolyd.	5' après inf.	0.489	4.7×10^8
infecté	rifampicine	5' après inf.	0.508	3.1×10^8

Table 6 : action de la streptolydigine sur la croissance de R17

Une culture de AS 19 ayant crû jusqu'à une D.O.₅₅₀ = 0.45 dans le milieu M9S est divisée en 7 lots de 2.5 ml qui sont traités comme indiqué dans la table ci-contre. Concentrations des antibiotiques : rifampicine 8 μgr/ml, streptolydigine 24 μgr/ml. Multiplicité d'infection : environ 40. Après 3 heures d'agitation à 37°C, les cellules sont traitées au CHCl₃ et les titres en phages déterminés.

a) après 3 heures d'incubation à 37°C. OD₅₅₀ au départ = 0,45

b) lyse spontanée

b) Relations entre R17 et le chromosome bactérien

Les résultats des expériences présentées au paragraphe précédent peuvent être expliqués par deux types d'hypothèses (autour desquelles il est possible de construire plusieurs variantes) : la première propose que c'est l'ARN polymérase elle-même qui est requise lors du développement phagique, l'autre qu'est essentiel un produit de son activité, donc une fonction bactérienne; dans ce cas, ce produit doit être nécessairement labile : en effet, s'il ne l'était pas, les phages pourraient se développer même en absence de sa synthèse. En considérant les expériences avec la streptolydigue et l'actinomycine, on pourrait supposer que la deuxième hypothèse est plus vraisemblable que la première : en effet, si les deux antibiotiques bloquent la progression de l'enzyme sur l'ADN, la streptolydigue l'inhibe chimiquement, l'enzyme est donc modifiée dans sa composition, alors que l'actinomycine l'arrête physiquement, l'enzyme reste donc intacte. Mais on pourrait soutenir que, dans ce dernier cas, elle est quantitativement bloquée sur l'ADN, et ainsi rendue indisponible pour la fonction structurale requise par le virus. Les deux hypothèses restent donc toutes deux plausibles. Afin d'étudier cette question, nous avons tenté d'éliminer la fonction matricielle de l'ADN en espérant conserver une ARN polymérase intacte.

Une des manières d'aborder ce genre d'expérience était de détruire l'ADN cellulaire au moyen de la Colicine E₂ (ColE₂) (90, 3) : nous avons donc examiné la production de phages dans des cellules traitées avant ou après l'infection avec de la ColE₂; notons que T₄ et λ (169) se développent à peu près normalement dans de telles cellules. Les résultats d'une expérience sont donnés sur la figure 17 où l'on constate que la ColE₂ affecte sévèrement la répllication de R17; son action est un peu différente suivant son temps d'addition : à 15 minutes après l'infection on atteint un plateau nettement plus élevé que si la ColE₂ est ajoutée avant l'infection. Ce plateau représente probablement des phages résiduels ou une quantité de produit labile synthétisée suffisante pour permettre la production d'un certain nombre de phages.

Ces expériences, qui confirment celles de Fujimura (65), suggèrent que la répllication de R17 est dépendante d'un produit labile codé par l'ADN bactérien.

Différents auteurs sont, par d'autres moyens, parvenus récemment à la même conclusion : Passent et Kaesberg (178) montrent que la rifampicine inhibe la synthèse d'une fonction cellulaire nécessaire à l'assemblage du phage alors que les expériences d'Engelberg et Soudry (48, 49) indiquent que ce serait plutôt le relâchement qui serait affecté.

Afin de déterminer si R17 est dépendant de la réplication de l'ADN bactérien, nous avons entrepris quelques expériences avec la cellule T46. Il serait peut-être opportun d'en décrire tout d'abord les caractéristiques qui ont été utilisées dans nos essais. T46 possède une mutation thermo-sensible (ts) dans l'initiateur de la réplication d'ADN : elle croît normalement à 30°C, cesse toute initiation de la synthèse d'ADN à 42°C mais termine à cette température un cycle réplcatif commencé (30 - 45 minutes) (18). Les cellules survivent à 42°C pendant au moins 5h30 (18). Il manque à haute température une protéine de la membrane cellulaire présente à 30°C (196). La synthèse des protéines (donc aussi d'ARN) est normale pendant encore 3 à 4 heures à 42°C (18) et, si la température est abaissée à 30°C, la synthèse d'ADN reprend et les cellules se divisent de façon synchrone (18, 91). Donc l'ADN n'est pas dégradé. Les phages λ (161), T₄, T₅, T₆ et T₇ (18) se développent normalement dans ces cellules mises pendant 1h30 au moins à 42°C et donnent des titres comparables à ceux obtenus à 30°C. Donc la machinerie biochimique cellulaire est en parfait état. Il existe enfin un état dit d'intégration suppressive (168) où un épisome F⁺ s'intègre au chromosome bactérien (fréquence 3×10^{-3}) donnant, à partir d'une T46 F⁺, une T46 Hfr dont l'ADN, à haute température, est reproduit par le mécanisme épisomique de réplication. La piliation de T46 F⁺ et de T46 Hfr n'est pas affectée à 42°C (30).

Nous avons testé l'efficacité d'étalement de cette cellule, après 0 à 120 minutes de préincubation à 42°C, sur un indicateur à 30°C (réversion de la mutation) ou à 42°C (non-réversion). La figure 18 donne les résultats de cette expérience : on constate que l'efficacité d'étalement des cellules maintenues à 42°C (donc dans des conditions où l'initiation de la synthèse d'ADN n'est jamais restaurée) décroît en 15 minutes de préincubation (+3' d'adsorption) de plus de 90 % par rapport à celle du témoin. Si, par contre, l'initiation de la synthèse est restaurée (préincubation à 42°C, étalement à 30°C), l'efficacité d'étalement de R17 est de 5 à 10 fois supérieure mais elle se situe bien en dessous de la valeur du témoin.

Cette expérience exigeait d'éclaircir une première hypothèse : la fonction ts de l'initiateur de la réplication de l'ADN serait-elle la fonction labile requise par le phage ?

Nous avons, pour répondre à cette question, examiné si une cellule T46 Hfr (donc connaissant l'intégration suppressive) pouvait produire des phages à 42°C. Nishimura et coll (163) ont en effet montré que, dans ce cas, la mutation ts persiste et par conséquent que la protéine ts de l'initiateur n'est pas synthétisé à 42°C. Les résultats de cette expérience nous ont indiqué, comme d'ailleurs Nishimura et coll. l'avaient constaté pour MS2, que R17 croît normalement sur T46 Hfr à 42°C.

Nos expériences avec T46 nous permettent de tirer trois conclusions :

1. La mutation engendre à 42°C deux effets :

a) la destruction de la protéine ts de l'initiateur et, conséquemment à cette destruction,

b) la baisse progressive de la synthèse d'ADN (18).

Comme la fonction ts de l'initiateur n'est pas requise par le phage (R17 croît sur T46 Hfr à 42°C), on peut conclure qu'il exige, pour croître, que la synthèse d'ADN bactérien ait lieu.

2. La comparaison des cinétiques d'efficacité d'étalement à 42 et 30°C montre que cette synthèse d'ADN bactérien est requise au début de la croissance virale.

3. Cette exigence de synthèse d'ADN ne concerne pas l'épisome non intégré (comparaison entre T46 F⁺ et T46 Hfr à 42°C).

c) Discussion et conclusion

Les expériences que nous venons de décrire suggèrent qu'il existe, entre le phage infectant et sa cellule-hôte, une relation bien plus intime qu'on ne le supposait et qui dépasse la simple fourniture de matériaux biochimiques et de "services" comme la synthèse des protéines par exemple (voir Introduction de cette thèse). En effet, la stricte dépendance de la réplication virale de l'activité de l'ARN polymérase et, dans une moindre mesure (voir figure 17), de la synthèse d'ADN bactérien sont difficiles à expliquer; on est tenté de se demander si la réplication des phages à ARN ne passerait pas par une étape à ADN.

Or, nos observations, ainsi que celles d'autres chercheurs (65, 178, 48, 49, 50 */) s'avèrent sur ce point en contradiction avec les conclusions de travaux relativement anciens (voir ci-dessous) publiés sur la réplication des phages à ARN qui généralement aboutissent à l'idée d'une totale indépendance entre le mécanisme de réplication du phage et celui de la cellule-hôte. Cette contradiction nous a incité à réexaminer de façon critique et à la lumière des connaissances actuelles les éléments qui militaient en faveur de cette indépendance.

*/ H. Engelberg a très récemment (août 1972) (50) montré que la rifampicine réprime in vivo la réplication de l'ARN de MS2 : les brins "-" ne sont synthétisés qu'à un taux réduit, alors que les brins "+" ne le sont plus du tout.

Deux types de publications se sont attachés à démontrer que la répllication des phages à ARN ne passe pas par une étape désoxyribo-nucléique. Le premier type consistait à infecter des cellules soit carencées en un élément nécessaire à la répllication de l'ADN, soit à les traiter avec des antibiotiques ou des analogues de bases bloquant la répllication. Les résultats de ces expériences sont assez contradic-toires (parfois chez le même auteur : comparer 87 et 89 par exemple) : dans une première publication (87) il est montré que l'actinomycine (104) permet la répllication de MS2 alors que dans une publication ultérieure (89), elle l'inhibe; de même, il est montré que la carence en thymine, dans des cellules thymine⁻, n'affecte que peu (35, 94) la répllication des phages à ARN alors que plus tard elle la bloque (252). Il est enfin décrit dans certains travaux (35) que cette répllication est résistante à la mitomycine alors que l'on reporte ultérieurement que cet antibiotique affecte également l'ARN (132); on peut émettre une remarque identique à propos du 5 fluoro-uracile que l'on estimait agir au niveau de l'ADN (97) et qui, pour Cooper et Zinder (35) n'in-hibe pas la répllication de f2, alors que l'on sait maintenant qu'il intervient au niveau de l'ARN (33, 192) et conséquemment qu'il bloque la répllication des phages à ARN (198). Quant aux résultats de l'expé-rience de Cooper et Zinder (35) avec l'analogue de base FUDR (désoxy-ribo-fluoro-uracile), ils nous paraissent plus montrer la nécessité de la synthèse d'ADN et d'ARN que l'indépendance de la synthèse d'ARN phagique de celle de l'ADN bactérien. Watanabe et August (236) citent l'emploi d'autres antibiotiques bloquant la répllication des phages à ADN et qui n'affectent pas la répllication du bactériophage R-23 (du groupe I comme R17, voir Introduction de cette thèse) sans donner toutefois de valeurs expérimentales */.

Le deuxième type consiste en une publication de Doi et Spiegelman (198) montrant par hybridation qu'il n'y a pas de séquences complémentaires à l'ARN viral de MS2 dans l'ADN bactérien extrait au phénol de cellules infectées **/; cette expérience suggère qu'il n'exis-te pas d'ADN viral intégré dans les cellules infectées mais n'élimine pas la possibilité de la présence d'un ADN non intégré dont le P.M. simple brin serait de 10⁶ daltons (soit la valeur d'un génôme de R17) et qui aurait échappé à leurs investigations. Elle n'exclut pas non plus la possibilité que quelques cellules seulement dans la population puissent posséder un ADN viral intégré.

Ainsi donc, la question reste ouverte.

*/ certains auteurs (35), pour supporter l'hypothèse que les phages à ARN ne passent pas par une étape désoxyribonucléique, ont utilisé comme argumentation des résultats obtenus avec des virus animaux (203). Ceci paraît aujourd'hui assez hasardeux car a) il n'est pas certain que leur mode de répllication puisse être valablement comparé à celui des phages, b) c'est chez certains de ces virus que fut découverte la transcription réverse (203, 225, 12, 212) et c) les hybridations dans le cas de virus animaux sont très difficiles (voir 12 par exemple.)

**/ notons que les formes répllicatives, résistantes à la RNase pancréatique (extraction au phénol), n'étaient pas encore découvertes. Ces auteurs ont donc effectué leurs hybridations en présence de grandes quantités d'ARN de brins "I" (qui dilueraient l'ARN marqué ajouté) et "-" (qui en-treraient en compétition avec l'éventuel ADN phagique).

Figure 15 : Action de la rifampicine sur la croissance de R17

A : Une culture de C600GF⁺/λ ayant crû dans le bouillon H jusqu'à une D.O.₅₅₀ = 0.5 est divisée en deux lots, infectés l'un par R17 sauvage, l'autre par MS2 sauvage (multiplicité = 5). 5 minutes après l'infection les deux cultures sont chacune divisées en 4 lots qui sont versés délicatement dans des erlenmeyers contenant de la rifampicine de façon que la concentration finale soit de 0,25, 50 et 100 µgr/ml. Les cultures sont ensuite agitées à 37°C jusqu'à ce que la lyse apparaisse dans l'erlenmeyer sans rifampicine (3 heures). Après addition de CHCl₃, les phages sont titrés sur C600GF⁺/λ. Les résultats sont exprimés en % des phages produits dans la culture sans rifampicine en fonction de la concentration en antibiotique.

□ — □ = R17

■ — ■ = MS2

B : Deux cultures (S26RIE et C600GF⁺/λ) dans le milieu H sont divisées en lots qui sont traités à 50 µgr/ml de rifampicine de 5 minutes avant l'infection à 20 minutes après. L'infection est le temps zéro. Multiplicité = 10. Après 3 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont traitées au CHCl₃ et les phages produits titrés. Les résultats sont exprimés en % des phages produits par une culture témoin sans rifampicine en fonction du temps relatif d'addition de la rifampicine pour les deux souches utilisées.

● — ● = S26RIE

○ — ○ = C600GF⁺/λ

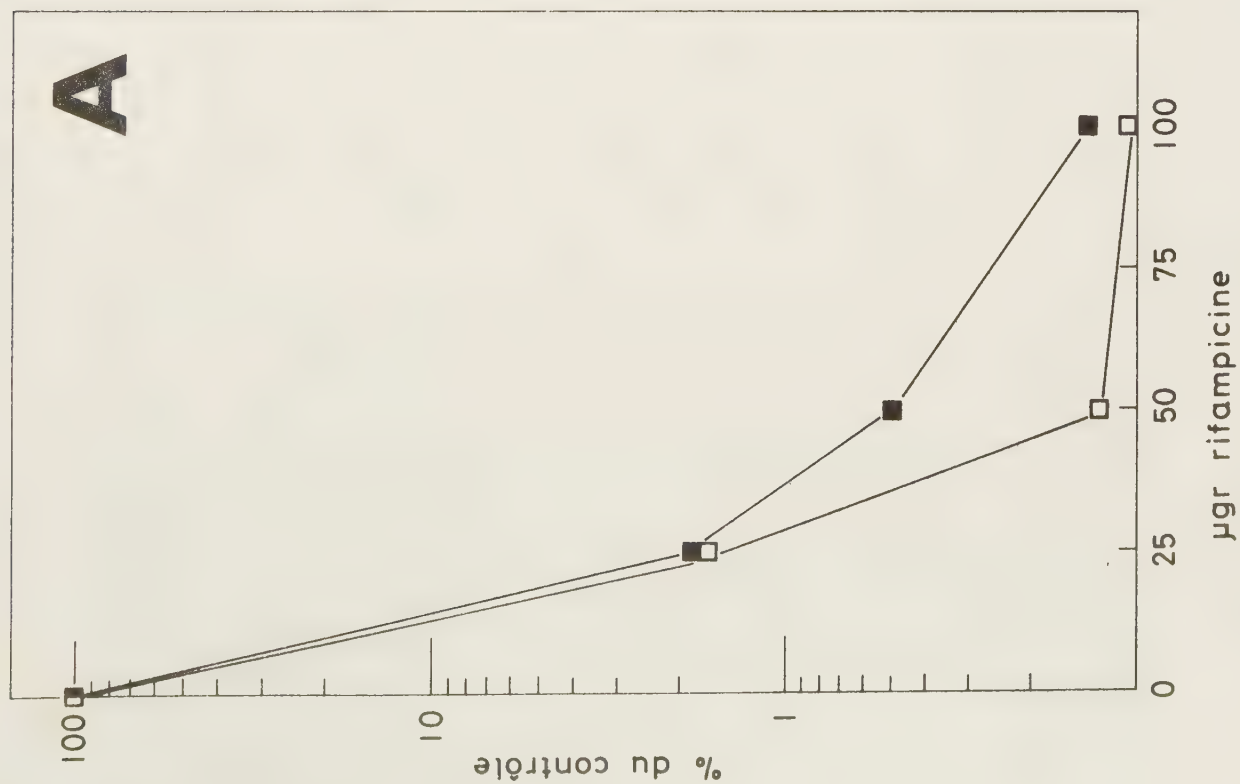


fig. 15

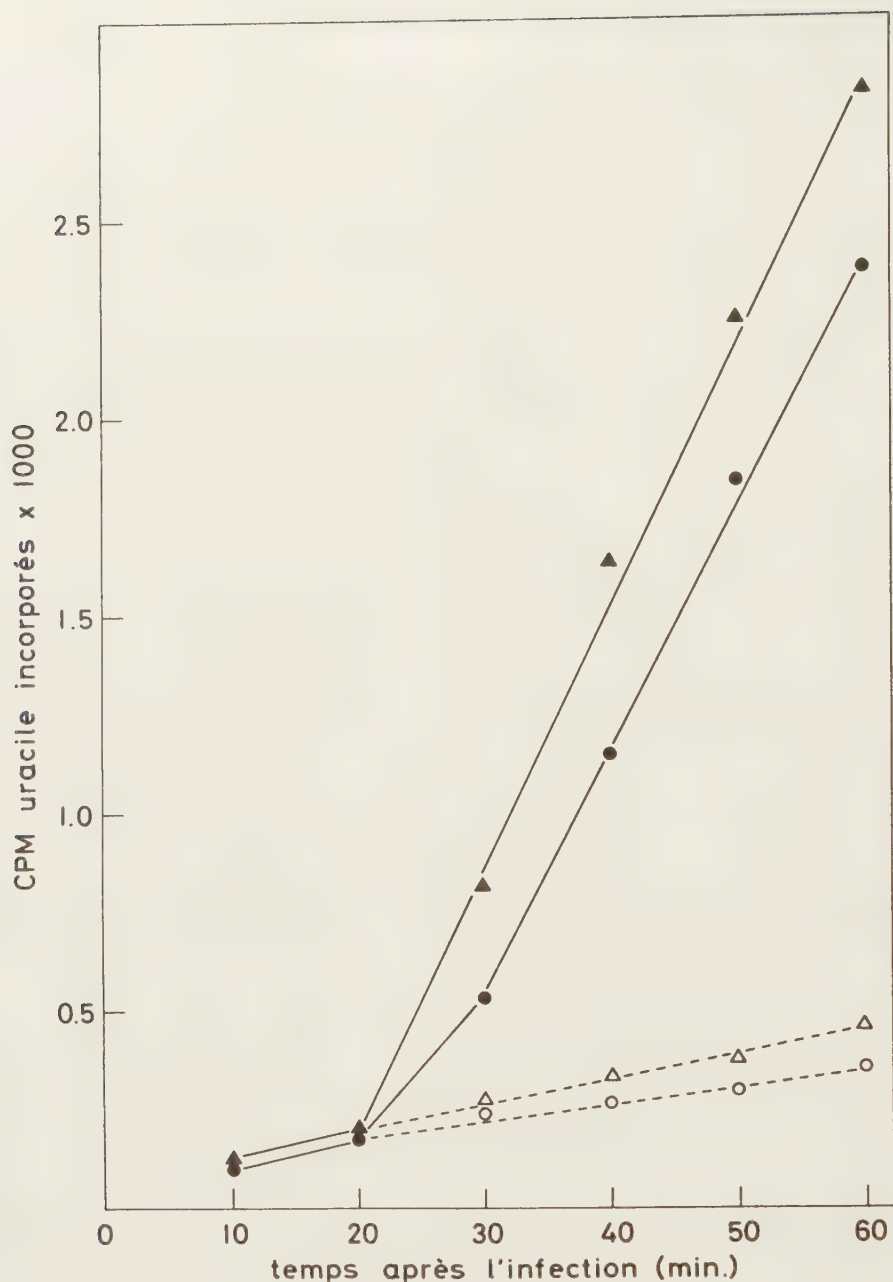


Figure 16 : Action de la rifampicine et de l'actinomycine D sur la synthèse d'ARN dans des cellules infectées.

Une culture de DIO ayant poussé dans le milieu MTPA (230) jusqu'à une D.O.₅₅₀ = 0.4 est traitée à l'EDTA (170, 163), divisée en 4 lots puis mise en présence de 25 $\mu\text{gr/ml}$ de rifampicine ou d'actinomycine D 8 minutes avant l'infection (multiplicité : environ 50). Cette dernière représente le temps zéro. L'uracile marqué (2.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{gr}$, 2.5 μCi par ml de culture) est ajouté au temps zéro. Des échantillons de 400 μl sont prélevés toutes les 10 minutes pendant une heure, précipités au TCA froid, filtrés et lavés sur GF/C puis comptés.

- ▲—▲ cellules traitées à la rifampicine infectées
- △---△ cellules traitées à la rifampicine non infectées
- cellules traitées à l'actinomycine D infectées
- cellules traitées à l'actinomycine D non infectées

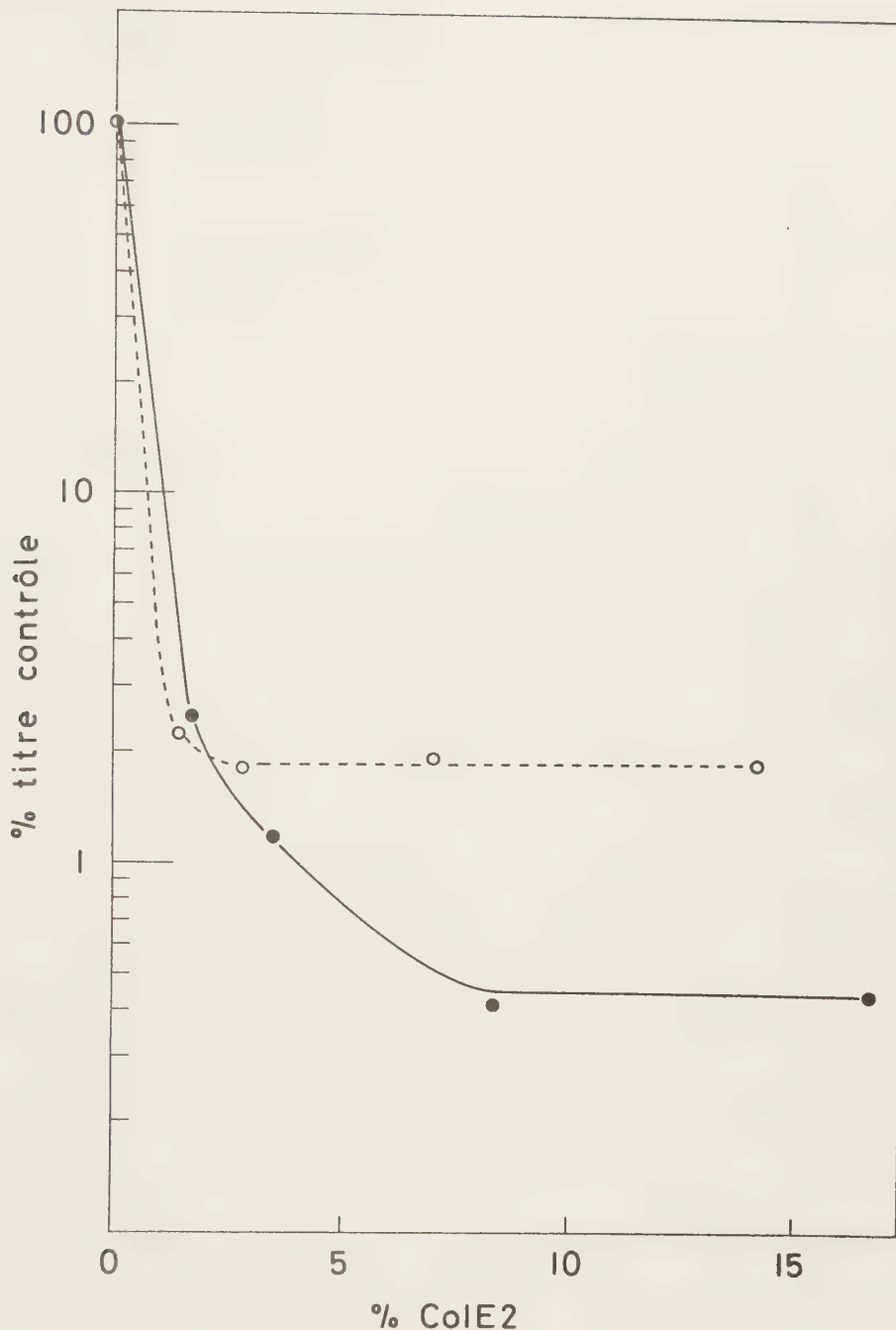


Figure 17 : effet de la Colicine E2 sur le développement de R17

K12 F⁻(ColE2) est cultivée en milieu H jusqu'à une phase stationnaire jeune puis la culture est centrifugée 30 minutes à 30'000 x g. Le surnageant chloroformé forme la solution stock de ColE2 (avant l'emploi le CHCl₃ est évaporé).

L'expérience consiste à traiter une cellule D10 infectée avec R17 (multiplicité = 3) avec des quantités croissantes de ColE2 soit 15 minutes avant (●—●), soit 15 minutes après (○---○) l'infection. Durée de l'incubation : 3 heures. Les cellules sont ensuite lysées et les phages titrés.

Les résultats sont exprimés en % de phages produits par rapport à un témoin non traité à la ColE2 en fonction de concentrations croissantes (en % du volume de culture) de ColE2.

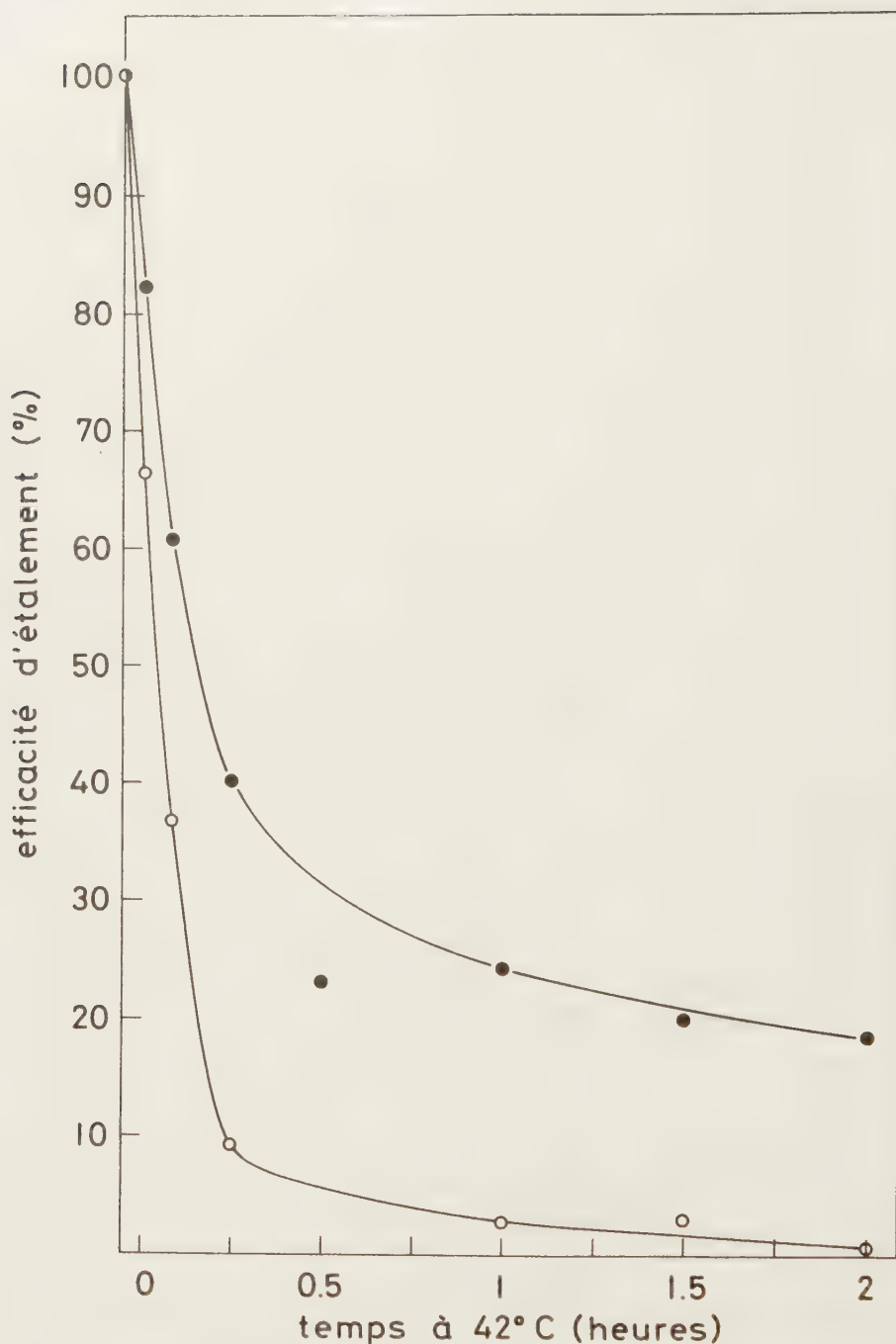


Figure 18 : effet de l'arrêt de la synthèse d'ADN sur le développement de R17

Une culture de T46 ayant crû dans du bouillon H jusqu'à une $OD_{550} = 0.4$ à 30°C est transférée à 42°C pendant des temps variables (indiqués en abscisse). 0.7 ml de suspension cellulaire est mis en contact durant exactement 3 min. à 42°C avec 446 phages actifs qui représentent 100 %. Après ces 3 min., l'échantillon est divisé en deux moitiés qui sont chacune étalées sur un gazon de D10. Une boîte est immédiatement mise à incuber à 42°C , l'autre à 30°C . Le lendemain, les titres en phages sont déterminés.

● — ● étalement à 30°C , ○ — ○ étalement à 42°C

Chapitre 2

LA SIMULATION LYSOGENIQUE

a) Introduction

La conclusion du chapitre précédent nous permet de suggérer une hypothèse de travail relativement simple, dans laquelle intervient la transcription réverse, qui permettrait de résoudre la complexité des relations qui semblent exister entre le phage à ARN et sa cellule-hôte. En voici les grandes lignes : l'ARN phagique pénètre dans la cellule, les premières protéines virales sont traduites et, parmi elles, la synthétase (cistronique puis enzymatique) qui réplique l'ARN phagique et ne cessera de le faire durant tout le cours de l'infection; sa production, toutefois, est, en regard de la totalité de l'ARN phagique synthétisé, relativement faible : elle n'est responsable que de la formation de quelques pourcents de phages observés dans les expériences décrites dans le chapitre précédent. Parmi les molécules d'ARN répliquées par la synthétase, quelques-unes sont transcrites en ADN (voir plus loin) complémentaire à l'ARN viral (donc en ADN de brin "-"). Cet ADN est alors répliqué à plusieurs exemplaires par la batterie enzymatique bactérienne (d'où la nécessité de la synthèse d'ADN) et sert de matrice à l'ARN polymérase (d'où la nécessité de son activité). Cette enzyme joue donc le rôle d'amplificateur en produisant de grandes quantités d'ARN phagique qui serviront à leur tour à la synthèse des protéines et à la formation des particules virales.

Cette hypothèse de travail appelle quelques commentaires :

- a) elle est compatible avec nos résultats précédents (et ceux d'autres chercheurs, voir chapitre précédent) : actions de la rifampicine et de la streptolydigne sur l'ARN polymérase, de la Cole2, de l'actinomycine et de l'initiateur ts de la synthèse d'ADN (T46) au niveau de l'ADN.
- b) la synthétase sert essentiellement à multiplier les molécules d'ARN viral au début de l'infection et, de ce fait, à augmenter la probabilité de la transcription réverse.
- c) cette transcription de l'ARN en ADN est une fonction de l'hôte. Plusieurs enzymes paraîtraient capables de catalyser chez E. Coli une telle réaction : certains travaux semblent en effet indiquer qu'une des DNA polymérases bactériennes est en mesure d'accomplir cette opération in vitro (32, 114) dans des conditions normales de sels et de pH, d'autres que l'ARN polymérase serait également capable de l'assurer

au moins partiellement (101, 248). D'autres publications enfin montrent qu'une étape de ce genre pourrait intervenir dans la répllication des épisomes bactériens (34, 184, 15), dans celle du chromosome d'E. Coli (217, 128, 156) ainsi que dans celle de phages à ADN (ϕ X174, M13 et f1) aussi bien in vivo qu'in vitro (116, 214, 249, 115) */.

L'hypothèse de travail que nous venons de décrire fut abordée expérimentalement par deux approches : la première consistait à répéter l'expérience de Doi et Spiegelman (198) en conservant les ADN de faibles poids moléculaires et en détruisant les formes répliquatives. Nous avons à plusieurs reprises tenté d'hybrider (158, 123) de l'ARN viral marqué au P^{32} (préparé par P.F. Spahr (72)) avec de l'ADN extrait de cellules infectées sans précipitations à l'éthanol salé **/. Ces hybridations ont été rendues difficiles au point de vue quantitatif par le fait que l'on recherchait quelque chose qui peut-être n'était présent qu'à l'état de trace. Les résultats obtenus excluent la présence de plus d'une dizaine d'équivalents d'ADN complémentaire à l'ARN viral marqué par cellule. Pour des raisons techniques (bruits de fond élevés), il ne nous a pas été possible de descendre au-dessous de cette valeur.

La seconde approche que nous avons utilisée pour aborder l'hypothèse de travail décrite plus haut fut la recherche d'un éventuel état correspondant à l'établissement de relations entre le phage et sa cellule hôte : cet établissement est bien connu pour le phage λ (voir 199 par exemple) sous le nom de lysogénie ***/ et a été décrit sous le nom d'état porteur ****/ pour M13 (93) et fd (92). En ce qui concerne les phages à ARN, Hoffmann-Berling (92) avait signalé qu'à 31°C le phage fr semble être relâché des cellules infectées sans qu'il y ait de lyse et Knolle (119) que, parmi les cellules survivantes d'une infection avec le même phage fr, certaines semblaient produire des phages.

*/ On sait en outre que Ross & coll. (189) ont récemment pu obtenir in vitro la transcription en ADN de l'ARN messager de la globine; ce mécanisme, en outre, assurerait l'amplification des gènes lors du développement des Batraciens (24, 147).

**/ une méthode préférable à celle que nous avons employée lors de ces tentatives a été ultérieurement publiée (Schekman et coll. (1971) J. Mol. Biol. 57, 177)

***/ le terme de lysogénie est réservé au phénomène d'intégration de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien avec ses conséquences (immunité, reproduction synchrone, induction, etc...)

****/ le terme d'état porteur ("carrier state") est réservé, dans cette thèse, à un phénomène de transmission interne de phage, sans qu'il y ait d'intégration. C'est probablement le cas pour M13 et fd (190, 174, 175, 93, 92).

Nous avons par conséquent recherché dans des populations de cellules infectées si l'une ou l'autre d'entre elles montrait, au cours de sa croissance, la capacité de produire des phages de façon continue et apparemment sans en être affectée. Cette recherche s'appuyait également sur une considération de nature écologique soulevée par Zinder (254) : comment les phages à ARN se maintiennent-ils dans leur biotope naturel, les eaux usées, lorsqu'on y connaît la fréquence des phages à DNA d'une part (21) et la rareté des cellules mâles ? Zinder suggère que leur hôte naturel ne serait peut-être pas une bactérie mais il se pourrait aussi que l'établissement d'une relation équilibrée entre phages et cellules en soit la raison.

b) les épisomes "clairs" et "troubles"

Lorsqu'un phage tue toutes les bactéries indicatrices avec lesquelles il est en contact, sa plage de lyse est claire, c'est-à-dire tout à fait transparente. Si elle est trouble, cela signifie que la population de cellules indicatrices est inhomogène; ce peut l'être soit parce qu'elle l'était déjà au départ (mélange de bactéries mâles et femelles par exemple) soit parce qu'elle l'est devenue à la suite de l'infection. Dans ce dernier cas la plage trouble peut provenir de l'établissement d'une relation équilibrée entre le phage et son hôte. C'est le cas lors de la lysogénie. Par ailleurs, cet établissement peut dépendre du génôme bactérien (69 par exemple) ou du génôme phagique : λ^+ présente une plage trouble, λ_{CI} par exemple en présente une claire (dans des conditions normales s'entend).

En ce qui concerne R17, nous avons constaté que le même stock de phages forme des plages claires sur certaines souches indicatrices et troubles sur d'autres dont l'homogénéité avait, au préalable, été assurée par l'établissement de clones issus de colonies uniques. La population cellulaire étant homogène, nous avons conclu que les plages troubles de R17 pouvaient provenir de l'établissement d'une relation équilibrée et que, si cette relation existe, elle dépend non pas du génôme viral mais de la cellule bactérienne.

Il devenait intéressant de déterminer l'élément cellulaire responsable de ce phénotype d'étalement. Le plus probable - et le plus aisé à tester - est l'épisome : nous avons, par les croisements 1 et 2, transféré dans la même cellule F^- un épisome provenant d'une cellule formant des plages claires et un autre provenant d'une cellule formant des plages troubles.

croisement 1 : $607 \text{ lac}^- F^- \times C600GF^+/\lambda$ (clair)

croisement 2 : $607 \text{ lac}^- F^- \times LC149 F' \text{ lac}$ (trouble)

Du croisement 1 on a sélectionné 27 colonies montrant le génotype de 607 */ dont 10 présentèrent des plages claires avec R17, aucune trouble et 17 furent résistantes. La souche à plages claires ainsi créée a été nommée 607 F⁺.

Du croisement 2 on a sélectionné 6 colonies lac⁺ Sm^R sur boîtes Mac Conkey qui toutes montrèrent des plages troubles avec R17. Elles possédaient tous les marqueurs génétiques de 607. La souche ainsi créée a été nommée 607 F' lac.

Donc deux cellules ayant exactement le même chromosome présentent des phénotypes de plages de lyse différents avec R17. Nous concluons que le phénotype d'étalement clair/trouble est contrôlé, dans notre cas au moins, par l'épisome sexuel et que, conséquemment, il en existe deux sortes : l'épisome clair F_c et l'épisome trouble F_t.

c) Isolement et propriétés de clones montrant la simulation lysogénique

Nous avons vu que, dans le cas des cellules porteuses des épisomes F_t, (par exemple LC149 F' lac), il est possible qu'une relation équilibrée s'établisse sous le contrôle du plasmide entre le phage et la bactérie-hôte. Pour la suite de nos expériences nous avons émis un postulat : si une telle relation s'établit entre phages à ARN et cellules mâles, ces dernières doivent satisfaire quatre conditions :

- a) la population doit croître normalement
- b) elle doit être résistante aux phages
- c) elle doit continuer à posséder l'épisome
- d) elle doit produire des phages

Comme cette relation, si elle existe, dépend de la cellule et non du virus (voir paragraphe précédent), la satisfaction de ces conditions ne peut pas être remplie au niveau de l'individualité cellulaire **/; c'est par contre possible au niveau d'une population de cellules et ce mécanisme permettrait alors d'assurer la pérennité à la fois des cellules mâles et des phages qui leur sont spécifiques.

Nous avons par conséquent sélectionné des colonies résistantes aux phages en infectant une culture de LC149 F_t' lac (voir paragraphe précédent) dans du bouillon H (multiplicité = 85) et laissé la densité optique à 550 mμ atteindre, après l'inflexion de la courbe lytique, le début de la phase stationnaire (6 heures après l'infection, titre des phages $5 \cdot 10^{11}$ par ml). Les cellules furent ensuite lavées

*/ (croissance sur M9 minimum + Sm, purE, try, lys, met, pro, leu, glu)

**/ en effet, une cellule unique, pour ce que l'on sait de la réplication des phages à ARN, ne peut être en même temps résistante aux phages et en produire; toutefois si l'intégration d'un ADN viral, comme c'est le cas chez λ, devait intervenir, ce serait possible.

deux fois par centrifugation dans du bouillon de culture, diluées, étalées pour former des colonies. Ces dernières furent ensuite répliquées sur velours et mises en contact avec un gazon de Q13 F_C⁺. Environ 5 % des colonies montrèrent un halo clair de phages les entourant et furent repiquées au cure-dent sur une boîte H épaisse. Elles peuvent être ainsi conservées à 4°C pendant deux mois environ sans autre problème que celui de la diffusion des phages dans l'agar, ce qui entraîne la formation, lors de répliques sur velours, de halos de plus en plus larges.

Les clones producteurs de phages ainsi sélectionnés furent soumis à des tests généraux dont voici les résultats résumés :

- a.- aucun halo n'est formé si le gazon indicateur contient de l'antisérum anti-R17. Le phage produit par les colonies est donc bien R17.
- b.- les clones forment eux-mêmes des gazons parfaitement homogènes : il n'y a ni plages ni granules.
- c.- leur temps de génération, tant en milieu riche (H) qu'en milieu minimum (M9), est identique à celui de la souche parentale placée dans les mêmes conditions. On ne constate donc pas de forte perturbation métabolique.
- d.- aucun, parmi les 61 clones producteurs de phages examinés, n'a montré de propriétés ts ($T^0 = 22^{\circ}, 28^{\circ}, 37^{\circ}$ et 44°C).
- e.- tous les marqueurs génétiques chromosomiques de la souche parentale se retrouvent dans ces clones. Il en est autrement de l'opéron lac plasmidiaire (voir plus loin).
- f.- les clones sélectionnés sont, en spot-tests (voir Matériel et Méthodes), tous résistants à toutes les dilutions de R17, QB et fd et sensibles aux mêmes dilutions de T₄, T₇ et λ_{vir} ^{*/}. Ils paraissent donc résistants aux phages s'adsorbant spécifiquement aux pilis mâles. Le cas de fd est intéressant car c'est un phage à ADN; cette résistance cellulaire toutefois peut être expliquée de deux façons :
 - 1) la cellule est résistante au phage en elle-même,
 - 2) il y a compétition entre les phages fd et les phages R17 produits par les cellules. Comme le montre la table 7 ^{**/}, R17 entre en compétition avec fd. Nous établirons plus loin (§ d) la résistance de ces populations à fd.

^{*/} ce dernier fut testé sur boîte LA car λ ne croît pas dans des cellules étalées sur boîte H.

^{**/} ces résultats sont en accord avec ceux de Silverman et coll. (169). La valeur de 54 % lors de la co-infection R17 et fd nous paraît trop élevée.

- g.- les clones producteurs de phages ségrègent rapidement des colonies non productrices : une population étalée à l'anse de platine puis répliquée sur un gazon de bactéries porteuses du F_C^+ ne possède que 10 % environ de cellules formant des halos; ces dernières à leur tour ségrègent environ 10 % de cellules formant des halos; on peut répéter cette opération indéfiniment. Les clones sont donc inhomogènes en ce qui concerne la production de phages.
- h.- lorsqu'un clone producteur de phages croît dans un bouillon riche, on constate (voir Table 8) que (1) le nombre de phages dans le milieu croît régulièrement au cours du temps et (2) que le rapport phage / bactérie augmente en cours de croissance; cela indique que la production de virus, contrairement à ce qui se passe lors de la lysogénie, n'est pas synchronisée avec la duplication de l'ADN bactérien.
- i.- une colonie ne produisant plus de halo, issue d'un clone producteur de phages, a définitivement perdu sa capacité de former des halos (sauf si on la "réinfecte", voir plus loin). La production de phages ne paraît donc pas être un phénomène latent, commun à toutes les cellules et ne s'exprimant que dans 10 % des cas, mais plutôt une propriété labile et transmissible.

Parmi les propriétés sus-mentionnées, certaines ressemblent à la lysogénie ("immunité", production de phages, pas d'affection métabolique notable) et d'autres s'en distinguent nettement (ségrégation rapide de cellules non productrices de phages, asynchronisme de la production virale). Toutefois la ressemblance qui rattache ces propriétés à la lysogénie nous l'a fait nommer la "simulation lysogénique".

Avant de chercher à élucider le mécanisme de la simulation lysogénique, il nous fallait tenter de déterminer si elle était en rapport avec le caractère morphologique F_t (voir paragraphe précédent). Nous avons prélevé de plages claires ou troubles provenant de "spot - tests" (voir Matériel et Méthodes) sur D-10 (F_t^+), LC149 $F_t^+ \text{ lac}$ et Q13 F_C^+ , toute une série de colonies résistantes à la lyse. Après avoir été lavées, ces dernières furent testées pour leur capacité de former des halos : aucune colonie productrice de phages ne fut trouvée avec Q13 alors que 30 % environ pour D-10 et 5 % environ pour LC149 produisant des halos caractéristiques.

Il semble donc que la simulation lysogénique soit en rapport avec le phénotype d'étalement trouble.

Table 7

	R17		fd	
	Titre/ml	%	Titre/ml	%
R17 seul	1.7×10^{11}	100	-	-
fd seul	-	-	8.5×10^{10}	100
R17 et fd en même temps	1.9×10^{11}	112	4.6×10^{10}	54 (?)
R17 puis fd (8' après)	2.0×10^{11}	118	1.4×10^{10}	17
fd puis R17 (8' après)	1.6×10^{11}	94	2.0×10^{10}	24

Table 7 : compétition entre R17 et fd

Une culture de Q13 (bouillon H) ayant atteint une densité de 2×10^8 cellules/ml est répartie en aliquots de 10 ml dans 6 erlenmeyers de 100 ml. Les bactéries sont ensuite infectées à une multiplicité de 10 avec R17 et/ou fd comme indiqué dans la table. La sixième culture sert à contrôler l'absence de phages avant l'infection. Après 3 heures d'incubation à 37°C, les titres des phages sont déterminés par étalement sans antisérum (titres totaux) et avec antisérum anti-R17 (titres de fd). Les titres de R17 sont obtenus dans chaque cas en soustrayant le titre fd du titre total.

Table 8

temps relatif	densité cellulaire par ml	densité de phages par ml	rapport phage bactérie
0'	8.1×10^6	5.0×10^5	0.062
60'	3.4×10^7	6.8×10^6	0.2
90'	8.5×10^7	9.8×10^7	1.15
120'	2.3×10^8	4.5×10^8	1.95
180'	9.7×10^8	3.3×10^9	3.4
240'	1.0×10^9	2.5×10^9	2.5

Table 8 : production de phages au cours de la croissance d'un clone

producteur de phages

Un clone formant un halo, ayant poussé dans du bouillon H (voir Matériel et Méthodes), est lavé deux fois dans du milieu frais pour éliminer les phages libres. Le culot resuspendu dans du milieu frais sert à infecter 20 ml de bouillon. Des aliquots sont prélevés aux temps indiqués dans la table et les concentrations en phages et en bactéries déterminées par étalement (1).

d) la simulation lysogénique est-elle due à une transmission interne
ou externe de phages ?

Deux modes de transmission des phages peuvent être envisagés : l'un est interne, l'autre est externe.

a) mode interne : nous avons vu au paragraphe précédent qu'un clone producteur de phages ségrège, dans une grande proportion, des cellules qui ne produisent définitivement plus de virus. Ce fait suggère qu'un mode de transmission interne stable, comme c'est le cas lors de la lysogénie, est improbable (voir ci-dessous). Par contre un mode de transmission interne instable, du type de la transduction abortive (voir schéma ci-dessous), permettrait de rendre compte de cette ségrégation :



(* = cellule porteuse d'un caractère)

au cours de ses divisions successives, une cellule infectée de façon permanente produit de temps en temps quelques phages et ne transmet cette propriété qu'à une faible proportion de sa descendance.

b) mode externe : aucune cellule, dans la population, n'est infectée de façon permanente mais les bactéries possèdent un épisome dont une ou plusieurs fonctions sont bloquées de manière plus ou moins efficace, ce qui empêcherait l'infection. Une petite proportion de cellules, ayant un épisome fonctionnel, sont infectées et lysent.

Afin de déterminer le mode de transmission des phages, nous avons tout d'abord examiné la production de phages par des cellules isolées lors d'une expérience de "single burst" */. Un clone producteur de phages, lavé quatre fois dans du tampon BU (voir Matériel et Méthodes), fut dilué dans du bouillon H et réparti en 36 tubes (4 ml/tube) de façon à obtenir une distribution statistique de 1.06 cellule par tube. Après trois heures d'incubation à 37°C avec une

*/ examen du titre de phages produits par des cellules isolées.

agitation assez forte, les tubes furent traités au CHCl_3 et des portions de un ml titrées pour les phages. Sur les 36 tubes, 4 présentèrent plus de 2 centres infectieux :

tubes N°	nombre de phages dans le tube
5	4272
22	420
28	420
34	4782

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux de Rappaport (183) qui constate de très fortes différences entre des cellules individuelles infectées avec MS2.

Un tube parallèle contenant des cellules non infectées a montré que, durant les trois heures de l'expérience, les cellules ont crû de 4.5 générations. On peut donc calculer que le nombre de cellules obtenues après ces trois heures d'incubation était de :

$$(36 - 4 \text{ */}) \times 1.06 \times 2^{4.5} = 768 \text{ cellules}$$

Sur ces 768 cellules, 4 ont lysé. On constate donc qu'environ une cellule sur 200 lyse au cours d'une culture.

Nous avons dit un peu plus haut que 4 tubes montrèrent plus de deux centres infectieux; un certain nombre de tubes, en effet, montrèrent une ou deux plages lors de l'étalement, bien que la culture ait été préalablement lavée de façon très consciencieuse. Cette constatation laisse supposer que des phages sont adsorbés sur des cellules et sont ainsi conservés pendant plusieurs lavages.

Nous avons examiné cette hypothèse en lavant plusieurs fois les cellules d'un clone producteur de phages et en comparant la cinétique de dilution des phages avec celle d'une culture de cellules F^- à laquelle on avait ajouté le même nombre de phages. La table 9 donne les résultats d'une telle expérience. On constate que, dans le contrôle, le titre en phages décroît en 3 lavages d'un facteur de 15'000 alors que, dans le clone producteur, il ne baisse que par un facteur de 50 et se stabilise à une valeur très élevée : 10^7 .

*/ on estime que les 4 cellules ayant lysé ne donneront pas de descendance.

Table 9

étapes	cellules par ml	phages par ml	
		dans 607	dans N° 14
début	5.8×10^7	1.63×10^9	1.64×10^9
1er surnageant	-	1.59×10^9	1.14×10^9
1er sédiment	5.4×10^7	1.40×10^7	3.86×10^8
2ème surnageant	-	1.37×10^7	2.15×10^8
2ème sédiment	5.6×10^7	2.0×10^5	7.1×10^7
3ème surnageant	-	2.1×10^5	4.0×10^7
3ème sédiment	6.4×10^7	1.1×10^5	3.6×10^7
4ème surnageant	-	8.8×10^4	3.4×10^7
4ème sédiment	4.9×10^7	8.0×10^4	4.6×10^7

Table 9 : Lavage des phages d'un clone producteur de phages

On a utilisé pour cette expérience une population clonale (N° 14) productrice de phages ayant crû dans du bouillon H ainsi qu'une culture de 607 F⁻ (également dans le milieu H) à laquelle on a ajouté un nombre de phages égal à celui trouvé dans la population clonale.

Les phages et les bactéries sont titrés dans les suspensions de départ; elles sont ensuite sédimentées et resuspendues quatre fois dans du tampon BU (voir Matériel et Méthodes). Les phages sont titrés dans chaque surnageant et les phages et les bactéries dans chaque sédiment resuspendu.

Ces résultats suggèrent que les phages sont aggrégés à la surface cellulaire et qu'ils n'en sont désadsorbés que progressivement lors des lavages; il est, en effet, statistiquement improbable qu'un nombre fixe de cellules lyse à chaque lavage pour produire les titres observés. Ceci tenderait plutôt à indiquer que la transmission des phages est due à un mécanisme externe.

Cette constatation nous permet de penser qu'il devrait être possible de débarrasser de ses phages un clone producteur. Pour ce faire nous avons cultivé en parallèle durant 25 générations deux sous-cultures provenant d'un même clone : l'une fut mise en présence de quantités saturantes, déterminées préalablement, de sérum anti-R17, l'autre fut cultivée sans antisérum. Alors que cette dernière présentait un titre de 3.7×10^9 phages par ml, la première en avait moins de 10^2 (l'antisérum empêchant de doser valablement en dessous de cette valeur).

Les cellules isolées et lavées (pour éliminer l'antisérum) de la culture "curée" */ ont montré les caractéristiques suivantes :

- a.- mêmes marqueurs chromosomiques que la souche parentale LC149;
- b.- forment en "spot-tests" des plages extrêmement troubles avec R17, Q β et fd;
- c.- temps de génération identiques à ceux de la souche parentale placée dans les mêmes conditions;
- d.- elles ne produisent plus de phages;
- e.- il est possible de les réinfecter : (multiplicité = 0.002)

temps relatif	densité cellulaire	titres de phages
0	5.34×10^6	1.16×10^4
6 heures	2.68×10^9	5.9×10^{10}

- f.- sur 999 colonies isolées provenant de cellules réinfectées, 18 montrèrent clairement à nouveau la capacité de former des halos.

*/ adjectif d'origine anglo-saxonne signifiant "guéri de"; nous utiliserons son parent français "curage, curer, etc..." dans le sens de "débarrassé, nettoyé, etc...".

De ces trois expériences, nous pensons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

- 1.- la simulation lysogénique est provoquée par une transmission externe des phages; en effet, il est possible de curer les cellules des phages infectant.
- 2.- les phages sont produits par quelques cellules de la population qui lysent de façon occasionnelle (expérience de single burst). Ceci explique que le temps de génération des clones producteurs de phages soit identique à celui de la cellule parentale placée dans les mêmes conditions.
- 3.- les phages sont adsorbés à la surface des cellules. Ces dernières donc, sous réserve de la spécificité d'adsorption des phages à ARN, possèdent toujours leurs pilis mais, pour une raison qui reste à élucider, elles empêchent les phages de pénétrer.
- 4.- les cellules curées sont à nouveau infectables et étalent R17, Q β et fd. Toutefois le phénotype des plages de lyse est extrêmement trouble. Ceci indique que la résistance des clones producteurs de phages est un phénomène transitoire, maintenu aussi longtemps que l'infection persiste. Le fait que le titre de phages et le rapport phage/bactérie obtenus lors de la réinfection soient plus élevés (en tout cas de 10 fois) que celui indiqué dans la table 8 semble bien le montrer : une partie des cellules du clone curé ont été réinfectées comme l'aurait été la souche parentale LC149.

Si donc l'établissement de la simulation lysogénique semble être contrôlé par une fonction épisomique (voir § c), son maintien paraît être assuré par la présence de phages dans le milieu de culture. Ce maintien peut être actif (le phage produit quelque chose qui entretient la simulation lysogénique au niveau bactérien) ou passif (le phage lyse les cellules sensibles qui apparaissent). Expérimentalement la façon la plus simple d'aborder ce problème était d'étudier l'évolution de la fonction épisomique dans les clones producteurs de phages et dans ceux qui en ont été curés. C'est le sujet du paragraphe suivant.

e) analyse de la simulation lysogénique au niveau épisomique

On se souvient que la cellule LC149 utilisée pour ces expériences possède, d'une part, une délétion de l'opéron lactose (son chromosome est donc lac^-) et, d'autre part, un épisome $\text{F}'\text{lac}$ qui la rend lac^+ . Une cellule ayant perdu son épisome deviendra donc lac^- . C'est en utilisant ce marqueur de la présence de l'épisome que nous avons analysé la simulation lysogénique au niveau épisomique.

Deux méthodes de détection de la fonction lac ont été utilisées :

(1) les boîtes indicatrices Mac Conkey (voir Matériel et Méthodes) où les cellules lac^- forment des colonies blanches et les lac^+ des rouges.

(2) lorsqu'il s'agissait d'isoler des colonies lac^+ pour des caractérisations (voir plus loin), nous avons préféré utiliser des boîtes minimum avec lactose; en effet, comme nous le verrons plus loin, les boîtes indicatrices ne permettent pas de distinguer si une colonie est 100 % lac^+ .

Dès le début de cette étude, nous avons constaté que les clones simulants */ qui avaient été isolés présentaient sur boîtes indicatrices, contrairement à la souche parentale LC149 uniformément rouge, quatre phénotypes :

- (a) des colonies rouges identiques au type parental,
- (b) des blanches,
- (c) des roses et

(d) des colonies mosaïques (généralement fond blanc avec taches rouges). Etalées à l'anse de platine, les colonies roses et mosaïques montrèrent nettement qu'elles étaient composées de cellules lac^- et lac^+ , bien qu'elles ségrégassent de nouvelles colonies roses et mosaïques. On peut en déduire que ces quatre phénotypes proviennent du mélange des génotypes lac^+ et lac^- , donc de cellules $\text{F}'\text{lac}$ et de F^- .

*/ l'adjectif "simulant" est utilisé dans le sens de "qui montre le phénomène de la simulation lysogénique" décrit au paragraphe c). Si la population simulante a été curée des phages à l'antisérum, elle sera indiquée comme "simulante curée".

Nous avons par ailleurs constaté qu'un même clone simulant, apparemment purement lac^+ , se compose, après étalement à l'anse de platine, de cellules lac^- non productrices de phages et de cellules lac^+ dont une partie seulement produit des phages. La Table 10 montre que 35 % des cellules issues de colonies simulantes lac^+ possèdent un phénotype lac^- après étalement.

Nous avons analysé en "spot-tests" (Matériel et Méthodes) la sensibilité à l'étalement de R17 de 10 colonies lac^- et 16 colonies lac^+ isolées à partir d'un clone lac^+ simulant étalé à l'anse de platine sur une boîte indicatrice comme ci-dessus. Les résultats ont montré que :

- les 10 colonies lac^- étaient résistantes au phage
- parmi les 16 colonies lac^+ :
 - .. 12 étaient sensibles aux phages et produisaient des plages troubles identiques à celles de la souche parentale;
 - .. 4 étaient totalement résistantes */ .

Ces trois types de cellules furent analysés.

a) analyse des cellules lac^-

Ces cellules pouvaient montrer un phénotype lac^- pour deux raisons :

- (1) parce que le phénotype correspondait au génotype (donc parce que l'épisome était perdu);
- (2) parce que une ou plusieurs des fonctions épisomiques sont bloquées de façon efficace.

La deuxième éventualité, bien que peu probable, fut examinée de deux façons :

- 1.- s'il y a blocage, il doit de temps à autre se passer un "accident" : par exemple dans le cas des lac^- , on devrait trouver dans leur descendance quelques cellules lac^+ . Parmi plusieurs centaines de cellules testées, nous n'en avons jamais trouvées sur boîtes indicatrices.

*/ selon les conventions en usage, la résistance sera symbolisée par la suite au moyen d'une barre oblique "/" et la sensibilité par " s ".

- 2.- nous avons également tenté de contraindre la cellule à utiliser la fonction bloquée : 10 colonies lac^- furent mises à croître sur des boîtes minimum avec lactose comme unique source de sucre. En 3 jours, aucune colonie n'apparut alors que sur des boîtes témoins contenant du glucose à la place du lactose, elles crûrent de façon identique à la souche parentale. Des résultats identiques furent obtenus en milieux liquides.

Un blocage de l'ensemble des fonctions épisomiques étant très improbable, il était possible d'examiner si le plasmide avait été perdu en tentant d'insérer un nouvel épisome F dans la cellule. Le croisement 3 a été entrepris dans ce but :

croisement 3 : LC 149 lac^- x T46 F' lac (à 30°C)

(sélection sur boîtes Mac Conkey lac à 42°C puis contrôle des marqueurs chromosomiques propres à LC149)

Les cellules obtenues (qui, théoriquement, ont un génotype identique à celui de la souche parentale) montrèrent toutes avec R17 des plages troubles identiques à celles formées par la souche parentale. La nouvelle souche présente un épisome stable (aucune cellule lac^- n'est ségrégée).

Ces résultats montrent que :

- 1) les clones simulants ségrègent des cellules ayant perdu leur épisome; et
- 2) que lesdites cellules ne l'ont pas perdu à cause d'une mutation chromosomique (251) puisqu'une fois réintroduit, il est stable.

b) analyse des cellules lac^+ R17^S et lac^+ /R17

Nous avons vu que, dans les clones curés, il existe des cellules lac^+ (donc présumablement F⁺) de type parental stable R17^S et d'autre de type instable /R17.

Les cellules de type parental ne présentent pour cette partie de l'étude aucun intérêt particulier.

Les cellules /R17 ont permis les constatations suivantes :

- 1) elles ségrègent des cellules lac^- (environ 5 %), des lac^+ /R17 (environ 95 %) et quelques $\text{lac}^+\text{R17}^S$ de type parental (< 1 %);
- 2) nous n'avons pas pu transférer efficacement leur épisome (les rares transferts observés (< 0.5 %) ont donné des cellules présentant des plages de lyse troubles qui pourraient fort bien provenir des $\text{lac}^+\text{R17}^S$ de la culture);
- 3) les phages s'adsorbent sur elles 2 à 3 fois moins bien que sur la cellule parentale (en milieu liquide). On constate que ce sont les cellules /R17 qui semblent être responsables de la présence des bactéries lac^- (F^-) dans les clones simulants et par ailleurs que leur épisome paraît être plus ou moins anormal (ségrégation de lac^- , difficulté de transfert, mauvaise efficacité d'adsorption des phages).

Finalement, si on compare le taux de cellules lac^- présenté sous chiffre 1) ci-dessus pour un clone simulant curé avec celui de la table 10, concernant un clone non curé, on constate une forte différence (5 % dans le premier cas, 35 % dans le second); nous tenterons d'expliquer ce fait au paragraphe suivant.

Table 10

Exp. N°	lac ⁺	lac ⁻	total	% lac ⁻
1	246	138	384	36
2	239	117	356	33
3	36	24	60	40
total	531	279	800	$\bar{x} = 35$
LC149 parental	282	0	282	0

Table 10 : ségrégation de cellules lac⁻ par des populations

clonales simulantes lac⁺

3 clones dont les phénotypes lac⁺ ont été contrôlés sont étalées à l'anse de platine sur des boîtes indicatrices Mac Conkey lac. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies lac⁺ et lac⁻ sont comptées. Les colonies roses ou mosaïques ne sont pas incluses dans la numération.

f) Discussion et conclusion sur le mécanisme de la simulation

lysogénique

Nous avons constaté au paragraphe b) de ce chapitre qu'il existe deux sortes d'épisomes F en ce qui concerne les phénotypes d'étalement de leur plages de lyse avec R17 : les F^+ et les F_t^+ , et au paragraphe c) que la simulation lysogénique semble liée au caractère phénotypique F_t^+ .

Nous avons, par ailleurs pu calculer, à partir des courbes de croissance et du taux de clones simulants obtenu chez IC149, le pourcentage de cellules qui, au moment de l'infection, sont "prêtes" à devenir simulantes; il se situe dans l'ordre de grandeur de 0.1 à 1 %. Cette valeur, en elle seule, est incompatible avec toute argumentation en faveur de la sélection, en cours de croissance, de mutants bactériens montrant la simulation lysogénique. Il faut donc admettre que la capacité d'établir la simulation existait déjà dans la population avant l'infection ou qu'elle est provoquée par celle-ci.

La simulation lysogénique paraît donc être la capacité de bloquer une fonction épisomique mâle nécessaire à la pénétration des phages (on pourrait dire que les cellules porteuses de F^+ ont perdu cette capacité). Notons qu'une telle idée n'est en soi pas nouvelle : on a décrit depuis assez longtemps des phénomènes de répression dans les rapports entre les épisomes F^+ et R_{fi}^+ (158).

Nous avons, par ailleurs, vu au paragraphe e) que les cellules /R17 ségrègent des cellules F^- . Notons ici aussi que la présence de cellules ayant perdu leur épisome à la suite d'une infection par un phage s'attaquant spécifiquement aux cellules mâles a déjà été décrite pour M13 (174, 175). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la présence de ces cellules F^- :

a.- le blocage de l'expression d'une fonction épisomique affecte la réplication de l'épisome : son temps de génération devient supérieur à celui de la cellule et par conséquent les cellules porteuses de cet épisome produisent des cellules sans plasmide sexuel; la population apparaît, après quelques générations, comme étant un mélange de cellules F^+ et de F^- . Dans ce cas, la ségrégation de cellules F^- ne se produirait que dans des populations simulantes.

b.- puisque l'épisome se réplique lui-même de façon autonome, on peut s'attendre à ce qu'au cours de sa croissance, une population de cellules ségrège momentanément une faible proportion de cellules F^- (213); du fait de la présence d'un grand nombre de cellules F^+ dans le milieu, ces dernières acquièrent immédiatement un nouvel épisome. La population paraît donc homogène.

La deuxième hypothèse nous paraît plus vraisemblable que la première (sans toutefois pouvoir exclure que les deux effets existent et puissent s'ajouter dans les faits) : en effet si une population porteuse d'un épisome F_C^+ est infectée et étalée sur boîte, il se forme des colonies résistantes qui sont $F^- *$, bien distinctes et totalement différentes du gazon d'une plaque trouble. Cette ségrégation semble donc être indépendante de l'établissement de la simulation lysogénique. Toutefois, comme nous l'avons dit plus haut, cette constatation n'exclut nullement un effet coopératif avec le blocage d'une fonction épisomique, mais il ne nous paraît pas nécessaire d'en tenir compte pour tenter d'expliquer les faits.

Nous avons décrit et analysé le phénomène de la simulation lysogénique. Nous pensons que les arguments avancés permettent d'envisager, par exemple, le modèle suivant :

Soit e^+ un caractère génétique présent dans F_t^+ permettant la simulation lysogénique et e^- sa mutation défective rendant l'épisome F_C^+ (nous justifierons plus loin l'idée de considérer F_t^+ comme type "sauvage" de F_C^+). Nous avons montré par des transferts réciproques que le caractère e se situe sur l'épisome (croisements 1 et 2).

Soit en outre r , le produit de e^+ ; r peut ou ne peut pas être synthétisé. Il provoque le blocage de la fonction épisomique nécessaire à la pénétration des phages. La souche parentale, phénotypiquement LC149 $F_t^+ \text{ lac}$ est, aux 99 %, composée de cellules $e^+ r^0$ (donc n'ayant pas de produit r synthétisé) et, pour environ 1 % (voir plus haut) de cellules $e^+ r^+$ (la souche Q13 F_C^+ serait, elle, e^- donc r^0).

En cas d'infection par un phage spécifique des cellules mâles, les cellules $e^+ r^0$ sont infectées et lysent; les $e^+ r^+$ survivent, se divisent et ségrègent environ un tiers de cellules F^- (les lac^-), deux tiers de $e^+ r^+$ (les $F' \text{ lac} / R17$) et quelques $e^+ r^0$ (les $F' \text{ lac} R17^S$) qui représentent environ 0.5 % de la population (paragraphe d)). Ces dernières sont immédiatement infectées, lysent et produisent ainsi, tout au long de la croissance de la population simulante, l'effet de la simulation lysogénique.

*/ nous avons pu réintroduire l'épisome $F' \text{ lac}$ de T46 (cf croisement 3) dans des cellules Q13 isolées d'une plaque de lyse de R17; ces cellules étaient donc bien F^- . Par ailleurs nous avons constaté que la LC149 parentale, cultivée pendant 24 heures à une densité cellulaire maintenue en-dessous de 10^5 bactéries / ml (afin de diminuer la probabilité de contacts cellulaires donc de transfert d'épisomes) montre sur boîte indicatrice Mac Conkey, environ 0.5 % de cellules lac^- .

Si l'infection persiste durant de nombreuses générations, la population aura tendance, proportionnellement, à s'appauvrir en cellules porteuses de l'épisome (en effet, les cellules F^- se divisent normalement alors que les $F^+/R17$ ségrègent environ un tiers de F^- ; il faut toutefois remarquer que l'épisome n'est pas perdu).

On constate que, sur le plan évolutif, la situation de l'épisome porteur du caractère e^+ (donc capable d'assurer la simulation lysogénique) est supérieure à celle de l'épisome porteur du caractère e^- . En effet, e^+ permet le maintien de l'épisome dans une population de cellules infectée avec un phage spécifique des cellules mâles. Ceci nous suggère que, si les deux épisomes F_c^+ et F_t^+ proviennent l'un de l'autre, F_t^+ représente le type "sauvage".

On pourrait ici spéculer sur l'avantage sélectif que présente la simulation lysogénique sur une population de cellules dans un biotope naturel; on constate en effet que, si l'infection cesse (par dilution dans un biotope naturel ou par curage dans nos expériences), la simulation lysogénique permet un "retour en arrière" : les cellules $e^+ r^0$ ne sont plus éliminées de la population et peuvent transférer leur épisome aux cellules F^- qui ont été ségréguées par les $e^+ r^0$. La figure 19 montre les résultats d'une simulation (sur calculatrice électronique) de l'évolution d'une population cellulaire de type LC149 simulante où l'infection a été maintenue durant 10 générations puis curée : on constate que 15 générations après le curage la population a atteint à nouveau les proportions parentales de 99 % de $F^+ lac e^+ r^0$ et 1 % de $e^+ r^+$, comme si l'infection n'avait pas eu lieu. On peut penser que ce serait à ce phénomène que l'on doit le fait que les populations curées peuvent à nouveau présenter des plages de lyse avec R17.

Apparemment les bactéries porteuses d'épisome sexuel sont, dans les biotopes naturels, nettement défavorisées : en plus des phages à ADN tels que T_4 , λ , P etc ..., elles peuvent être infectées par les phages spécifiques des cellules mâles. Il paraîtrait donc surprenant qu'au cours de l'évolution, ces cellules n'aient pas été éliminées par la sélection naturelle. Si notre hypothèse était exacte, la simulation lysogénique pourrait donc servir à combler ce désavantage sélectif des cellules porteuses d'épisome sexuel et par conséquent à participer au maintien de ce plasmide dans les milieux naturels.

Figure 19 : Evolution d'une population de cellules porteuses de l'épisome F_t^+ infectée durant 10 générations puis curée

L'évolution théorique d'une population de cellules possédant l'épisome F_t^+ (pour un milieu infiniment grand) a été étudiée au moyen d'une calculatrice électronique Helwett-Packard 9100B . Le programme a été conçu à partir des éléments décrits précédemment soit :

- 1) les $F^+/R17$ ségrègent deux tiers de $F^+/R17$ et un tiers de F^- ;
- 2) les $F^+ R17^S$ sont éliminées de la population en cas d'infection (simulation lysogénique) ;
- 3) après curage, les $F^+ R17^S$ peuvent transférer normalement leur épisome à des F^- ;
- 4) les $F^+ R17^S$ ségrègent à leur tour 1 % de $F^+/R17$.

Nous avons estimé le taux de transfert de l'épisome par les $R17^S$ à un par génération de cellules. La capacité de la calculatrice ne nous a pas permis d'introduire dans le programme un facteur correctif concernant les probabilités de rencontre entre cellules lors des transferts d'épisomes.

———— : taux de $F^+/R17$
- - - - : taux de F^-
• ——— • : taux de $F^+ R17^S$
↑
↓ : curage de la population

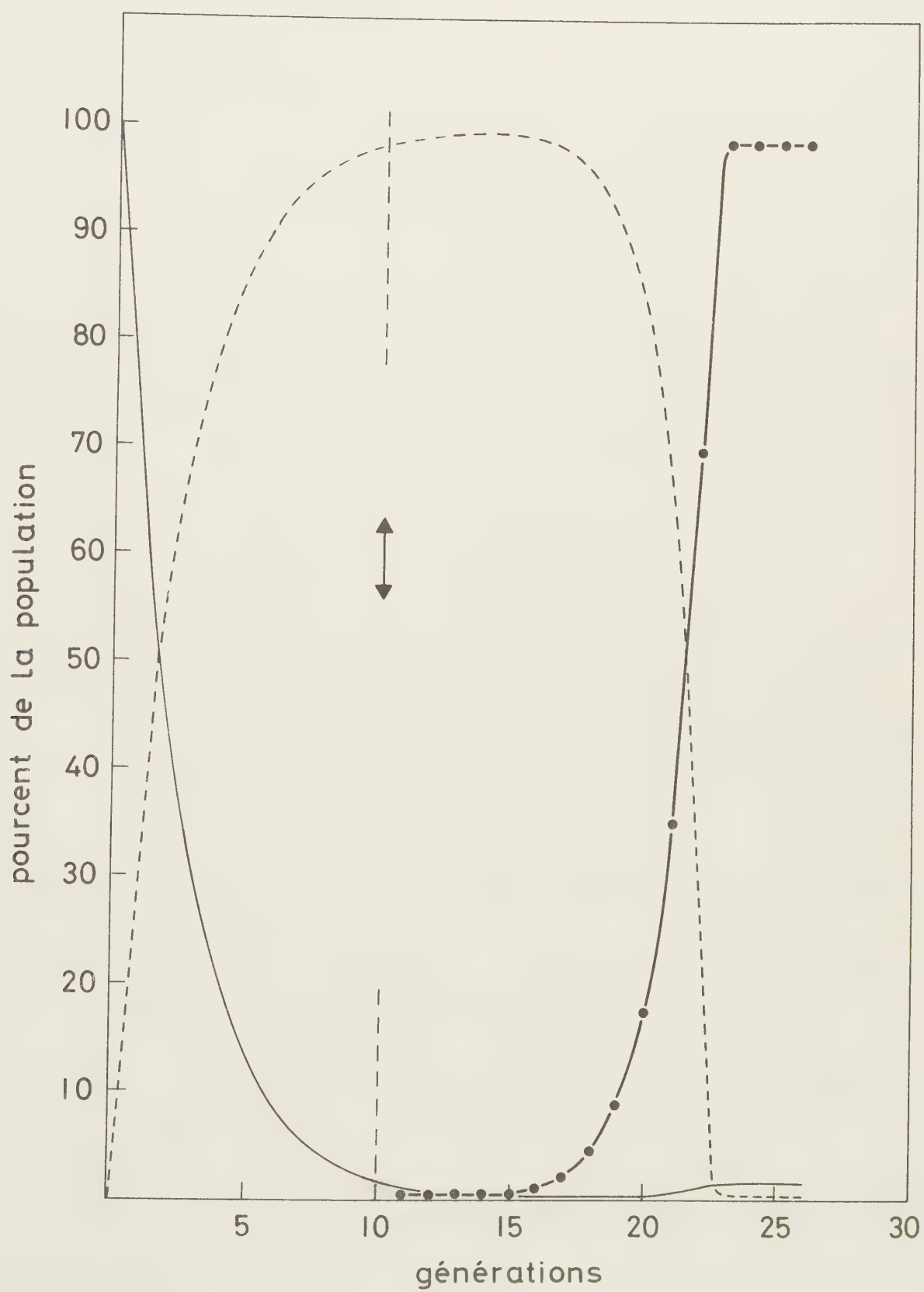


fig. 19

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

=====

- 1 - ADAMS M.H. (1959) in "bacteriophages", Interscience, New York
- 2 - ALBERTSSON P.-A. (1960) "Partition of Cell Particules and macromolecules" edited by Almqvist & Wiksell (Stockholm)
- 3 - ALMENDINGER R. and HAGER L.P. (1972) Nature New Biology 235, 199
- 4 - AMMANN J., DELIUS H. and HOFSCHNEIDER P.H. (1964) J. Mol. Biol. 10, 554
- 5 - ARGETSINGER-STEITZ J. (1968) J. Mol. Biol. 33, 923
- 6 - ARGETSINGER-STEITZ J. (1969) Nature 224, 957
- 7 - ARGETSINGER-STEITZ J. (1972) Nature New Biology 236, 71
- 8 - AUGUST J.T., SHAPIRO L. and EOYANG L. (1965) J. Mol. Biol. 11, 257
- 9 - AUGUST J.T. and EOYANG L. (1967) Methods in Virology 3, 99
- 10 - AUGUST J.T., BANERJEE A.K., EOYANG L., FRANZE DE FERNANDEZ M.T., HORI K., KUO C.H., RENSING U. and SHAPIRO L. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 73
- 11 - AUGUST T.J. (1969) Nature 222, 121
- 12 - BALTIMORE D. (1970) Nature 226, 1209
- 13 - BANERJEE A.K., EOYANG L., HORI K. and AUGUST T. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 986
- 14 - BANERJEE A., KUO C. and AUGUST J.T. (1969) J. Mol. Biol. 40, 445
- 15 - BAZZICALUPO P. and TOCCHINI-VALENTINI G.P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 298
- 16 - BENZER S. and CHAMPE S.P. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 114
- 17 - BERNARDI A. and SPAHR (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (sous presse)
- 18 - BEYERSMANN D., SCHLICHT M. and SCHUSTER H. (1971) Molec. Gen. Genetics 111, 145
- 19 - BILLETER M.A., DAHLBERG J.E., GOODMAN H.M., HINDLEY J. and WEISSMANN C. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 635
- 20 - BLUMENTHAL T., LANDERS T.A. and WEBER K. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1313
- 21 - BRADLEY D.E. (1966) J. Gen. Microbiol. 45, 63

- 22 - BRENNER S. and BECKWITH J.R. (1965) J. Mol. Biol. 13, 629
- 23 - BRETSCHER M. (1968) J. Mol. Biol. 34, 131
- 24 - BROWN R.D. and TOCCHINI-VALENTINI G.P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1746
- 25 - BURGESS R.R., TRAVERS A.A., DUNN J.J. and BAUTS E.K.F. (1969) Nature 221, 43
- 26 - CAPECCHI M.R. and GUSSIN G.N. (1965) Science 149, 417
- 27 - CAPECCHI M.R. (1966) J. Mol. Biol. 21, 173
- 28 - CAPECCHI M.R. (1967) J. Mol. Biol. 30, 213
- 29 - CARO L.G. and SCHNUS M. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 126
- 30 - CARO L.G. Communication personnelle
- 31 - CASSANI G., BURGESS R.R., GOODMAN H.M. and GOLD L. (1971) Nature New Biology 230, 197
- 32 - CAVALIERI L.F. and CARROLL E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1055
- 33 - CHAMPE S.P. and BENZER S. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 532
- 34 - CLEWELL D.B., EVENCHIK B. and CRANSTON J.W. (1972) Nature New Biology 237, 29
- 35 - COOPER S. and ZINDER N.D. (1962) Virology 18, 405
- 36 - CORY S., SPAHR P.F. and ADAMS J.M. (1970) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 1
- 37 - CRAWFORD E.M. and GESTELAND R.F. (1964) Virology 22, 165
- 38 - CRICK F. (1970) Nature 227, 561
- 39 - DANZIGER R.E. and PARANCHYCH W. (1970) Virology 40, 547
- 40 - DANZIGER R.E. and PARANCHYCH W. (1970) Virology 40, 554
- 41 - DAVIS J.E. and SINSHEIMER (1963) J. Mol. Biol. 6, 203
- 42 - DOI R.H. and SPIEGELMAN S. (1962) Science 138, 1270
- 43 - EDMUNDSON A. (1965) Nature 205, 883
- 44 - EGGEN K. and NATHANS D. (1968) Fed. Proc. 27, 645
- 45 - EGGEN K. and NATHANS D. (1969) J. Mol. Biol. 39, 293
- 46 - EIKHOM T.S. and SPIEGELMAN S. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1833
- 47 - ENGELBERG H. and ARTMAN M. (1970) J. Mol. Biol. 48, 181
- 48 - ENGELBERG H. and SOUDRY E. (1971) J. Virol. 7, 847
- 49 - ENGELBERG H. and SOUDRY E. (1971) J. Virol. 8, 257
- 50 - ENGELBERG H. (1972) J. Mol. Biol. 68, 541

- 51 - ENGELHARDT D.L., ROBERTSON H.D. and ZINDER N.D. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 972
- 52 - ENGER M. and KAESBERG (1965) J. Mol. Biol. 13, 260
- 53 - ERIKSON R.L., FENWICK M.L. and FRANKLIN R.M. (1964) J. Mol. Biol. 10, 519
- 54 - ERIKSON R.L., FENWICK M.L. and FRANKLIN R.M. (1965) J. Mol. Biol. 13, 399
- 55 - ERIKSON R.L. (1968) Annual Review of Microbiology 22, 305
- 56 - FEDOROFF N.V. and ZINDER N.D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1838
- 57 - FINCH and KLUG communication personnelle citée par Gussin et coll. (réf. 79)
- 58 - FISCHBACH F., HARRISON P. and ANDEREGG J. (1965) J. Mol. Biol. 13, 638
- 59 - FRANCKE B. and HOFSCHEIDER P.H. (1966) J. Mol. Biol. 16, 544
- 60 - FRANCKE B. and HOFSCHEIDER P.H. (1969) J. Mol. Biol. 40, 45
- 61 - FRANZE de FERNANDEZ M.T., EOYANG L. and AUGUST T.J. (1968) Nature 219, 588
- 62 - FRANZE de FERNANDEZ M.T., HAYWARD W.S. and AUGUST J.T. (1972) J. Biol. Chem. 247, 824
- 63 - FRIESER J.D. (1969) J. Mol. Biol. 46, 349
- 64 - FROMAGEOT H.P.M. and ZINDER N.D. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 184
- 65 - FUJIMURA R.K. (1966) J. Mol. Biol. 17, 75
- 66 - FUKAMI H. and IMAHORI K. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 570
- 67 - FURTH J.J., HURWITZ J., KRUG R. and ALEXANDER M. (1961) J. Biol. Chem. 236, 3317
- 68 - GAREN A. and SIDDIQI O. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 1121
- 69 - GEORGOPOULOS C.P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 2977
- 70 - GESTELAND R.F. and BOEDTKER H. (1964) J. Mol. Biol. 8, 496
- 71 - GESTELAND R.F. and SPAHR P.F. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 707
- 72 - GESTELAND R.F. and SPAHR P.F. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1267
- 73 - GODEFROY Th., COHN M. and GRUNBERG-MANAGO M. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 236
- 74 - GODSON G.N. (1968) J. Mol. Biol. 34, 149
- 75 - GRANBOULAN N. and FRANKLIN R.M. (1966) J. Mol. Biol. 22, 173

- 76 - GRONER Y., SCHEPS R., KAMEN R., KOLAKOFSKY D. and REVEL M. (1972) Nature sous presse
- 77 - GRONER Y., POLLACK Y., BERISSI H. and REVEL M. (1972) Nature sous presse
- 78 - GUSSIN G.N. (1966) J. Mol. Biol. 21, 435-453
- 79 - GUSSIN G.N., CAPECCI M.R., ADAMS J.M., ARGETSINGER J.E., TOOZE J., WEBER K. and WATSON J.D. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 257-271
- 80 - HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS - 44th edition - Chemical Rubber Publishing Co (ed.) Cleveland Ohio 44114
- 81 - HARTMANN G., HONIKEL K.O., KNUESSEL F. and NUESCH J. (1967) Biophys. Biochem. Acta 145, 843
- 82 - HARUNA I., NOZU K., OHATA Y. and SPIEGELMAN S. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50, 905
- 83 - HARUNA I. and SPIEGELMAN S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 579
- 84 - HARUNA I. and SPIEGELMAN S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1189
- 85 - HARUNA I. and SPIEGELMAN S. (1965) Science 150, 884
- 86 - HARUNA I., ITOH Y.A., YAMANE K., MIYAKE T., SHIBA T. and WATANABE I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1778
- 87 - HAYWOOD A.M. and SINSHEIMER (1963) J. Mol. Biol. 6, 247
- 88 - HAYWOOD A. and SINSHEIMER (1965) J. Mol. Biol. 14, 305
- 89 - HAYWOOD A.M. and HARRIS J.M. (1966) J. Mol. Biol. 18, 448
- 90 - HEIRSCHMAN H.R. and HELINSKI D.R. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5360
- 91 - HIROTA Y., MORDOH J. and JACOB F. (1970) J. Mol. Biol. 53, 369
- 92 - HOFFMANN-BERLING H. and MAZE R. (1964) Virology 22, 305
- 93 - HOF SCHNEIDER P.H. and PREUSS A. (1963) J. Mol. Biol. 7, 450
- 94 - HOF SCHNEIDER P.H. (1963) Zeit. für Naturf. 18B, 203
- 95 - HOHN T. (1969) European J. Biochem. 8, 552
- 96 - HORI K., EOYANG L., BANERJEE A.K. and AUGUST J.T. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1790
- 97 - HOROWITZ J., SAUKKONEN J. and CHARGAFF E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3266
- 98 - HOUWINK A.L. and WOUTERA VAN ITERSON (1950) Biochim. Biophys. Acta 5, 10
- 99 - HSU W.T. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 405
- 100 - HUNT D. and WATANABE M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 972

- 101 - HURWITZ J., YARBROUGH L. and WICKNER S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 628
- 102 - IPPEN K.A. and VALENTINE R.C. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 880
- 103 - IPPEN K.A. and VALENTINE R.C. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 21
- 104 - IYER V.N. and SZYBALSKI W. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50, 355
- 105 - JAIN S.C. and SOBELL H.M. (1972) J. Mol. Biol. 68, 1
- 106 - JEPPESEN P.G.N., ARGETSINGER-STEITZ J., GESTELAND R.F. and SPAHR P.F. (1970) Nature 226, 230
- 107 - JOCKUSCH H., BALL A. and KAESBERG P. (1970) Virology 42, 401
- 108 - KAERNER H.C. (1969) J. Mol. Biol. 42, 259
- 109 - KAERNER H.C. (1970) J. Mol. Biol. 53, 515
- 110 - KAMEN R. (1970) Nature 228, 527
- 111 - KAMEN R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 262, 88
- 112 - KAMEN R., KONDO M., ROEMER W. and WEISSMANN (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (sous presse)
- 113 - KAPLAN S., STRETTON A.O.W. and BENZER S. (1965) J. Mol. Biol. 14, 528
- 114 - KARKAS J.D., STAVRIANOPOULOS J.G. and CHARGAFF E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 398
- 115 - KARKAS J.D. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2288
- 116 - KELLER W. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1560
- 117 - KHATOON H., IYER R.V. and IYER V.N. (1972) Virology 48, 145
- 118 - KINARD F.E. (1957) Rev. Sci. Inst. 28, 293
- 119 - KNOLLE P. (1964) Virology 23, 271
- 120 - KOLAKOFSKY D. and WEISSMANN C. (1971) Nature New Biology 231, 42
- 121 - KOLAKOFSKY D. and WEISSMANN C. (1971) Biochim. Biophys. Acta 246, 596
- 122 - KONDO M., GALLERANI R. and WEISSMANN C. (1970) Nature 228, 525
- 123 - KOURILSKI P., MANTEUIL S., ZAMANSKY M.H. and GROS F. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1080
- 124 - KOZAK M. and NATHANS D. (1971) Nature New Biology 234, 209
- 125 - KOZAK M. and NATHANS D. (1972) Bacteriological Reviews 36, 109

- 126 - KRAHN P.M., O'CALLAGHAN R.J. and PARANCHYCH W. (1972) *Virology* 47, 628
- 127 - KRUGH T.R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 1911
- 128 - LARK K.G. (1972) *J. Mol. Biol.* 64, 47
- 129 - LEDERBERG J. and TATUM E. (1946) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11, 113
- 130 - LEVINTOW L. (1965) *Annual Review of Biochemistry* 34, 487
- 131 - LIN J.Y., TSUNG C.M. and FRAENKEL-CONRAT H. (1967) *J. Mol. Biol.* 24, 1
- 132 - LIPSETT M.N. and WEISSBACH A. (1965) *Biochemistry* 4, 206
- 133 - LODISH H. and ZINDER N.D. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 333
- 134 - LODISH H.F. (1968) *J. Mol. Biol.* 32, 681
- 135 - LODISH H.F. (1968) *Nature* 220, 345
- 136 - LODISH H.F. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 127
- 137 - LODISH H.F. (1969) *Nature* 224, 867
- 138 - LODISH H.F. and ROBERTSON H.D. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 655
- 139 - LODISH H.F. and ROBERTSON H.D. (1969) *J. Mol. Biol.* 45, 9
- 140 - LODISH H.F. (1970) *Nature* 226, 705
- 141 - LODISH H.F. (1971) *J. Mol. Biol.* 56, 627
- 142 - LOEB T. (1960) *Science* 131, 932
- 143 - LOEB T. and ZINDER N.D. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47, 282
- 144 - LOWRY O., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265
- 145 - Mac COLL R., BERNS D.S. and KOVEN N.L. (1972) *Virology* 48, 288
- 146 - MACH B. and TATUM E.L. (1963) *Science* 139, 1051
- 147 - MAHDAVI V. and CRIPPA M. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 1749
- 148 - MARGOLIASH E. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 2161
- 149 - MARINO P., BALDI M.I. and TOCCHINI-VALENTINI G.P. (1968) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32, 125
- 150 - MARVIN D. and HOFFMANN-BERLING H. (1963) *Nature* 197, 517

- 151 - MARVIN D.A. and HOHN B. (1969) Bact. Rev. 33, 172
- 152 - MATTHEWS K.S. and COLE D. (1972) J. Mol. Biol. 65, 1
- 153 - MATTHEWS K.S. and COLE D. (1972) J. Mol. Biol. 65, 17
- 154 - DI MAURO E., SNYDER L., MARINO P., LAMBERTI A., COPPO A.
and TOCCHINI-VALENTINI G.P. (1969) Nature 222, 533
- 155 - MELLI M., WHITEFIELD C., RAO K.V., RICHARDSON M. and
BISHOP J.O. (1971) Nature New Biology 231, 8
- 156 - MESSING J., STAUDENBAUER W.L. and HOFSCHEIDER P.H. (1972)
Nature New Biology 238, 202
- 157 - dans "METHODS IN ENZYMOLOGY" (COLOWICK S. et KAPLAN N.) (1957)
III, 448
- 158 - MEYNELL E., MEYNELL G.G. and DATTA N. (1968) Bacteriol. Rev.
32, 55 (Revue générale sur le sujet)
- 159 - MITRA S., ENGER M.D. and KAESBERG P. (1963) Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. 50, 68
- 160 - MIYAKE T., HARUNA I., SHIBA T., ITOH Y.H., YAMANE K. and
WATANABE I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 2022
- 161 - MONK M., and GROSS J. (1971) Molec. Gen. Genetics 110, 299
- 162 - NATHANS D., NOTANI G., SCHWARTZ J.H. and ZINDER N.D. (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 1424
- 163 - NATHANS D., OESCHGER M.P., EGGEN K. and SHIMURA Y. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1844
- 164 - NATHANS D., OESCHGER M.P., POLMAR S.K and EGGEN K. (1969)
J. Mol. Biol. 39, 279
- 165 - NIRENBERG M. and MATTHAEI J. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S. 47, 1588
- 166 - NISHIHARA T., HARUNA I., WATANABE I., NOZU Y. and OKADA Y.
(1969) Virology 37, 153
- 167 - NISHIHARA T. and WATANABE I. (1969) Virology 39, 360
- 168 - NISHIMURA Y., CARO L., BERG C.M. and HIROTA Y. (1971) J. Mol.
Biol. 55, 441
- 169 - NOMURA M. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 315
- 170 - OESCHGER M.P. and NATHANS D. (1966) J. Mol. Biol. 22, 235
- 171 - OSBORN M., WEINER A.M. and WEBER K. (1970) Eur. J. Biochem 17, 63
- 172 - OVERBY L.R., BARLOW G.H., DOI R.H., JACOB M. and SPIEGELMAN S.
(1966) J. Bacteriol. 91, 442
- 173 - PACE N., BISHOP D. and SPIEGELMAN S. (1967) Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. 58, 711

- 174 - PALCHOUDHURY S.R. and IYER V.N. (1968) Mol. Gen. Genetics 105, 131
- 175 - PALCHOUDHURY S.R. and IYER V.N. (1971) J. Bacteriol. 106, 1040
- 176 - PARANCHYCH W. and GRAHAM A.F. (1962) J. Cellular Comp. Physiol. 60, 199
- 177 - PARANCHYCH W. (1966) Virology 28, 90
- 178 - PASSENT J. and KAESBERG P. (1971) J. Virol. 8, 286
- 179 - PHILLIPS L.A., TRUDEN J.L., IGLEWSKI W.J., HOTAM-IGLEWSKI B. and FRANKLIN R.M. (1969) Virology 39, 781
- 180 - PLAPP B.V., RAFTERY M.A. and COLE R.D. (1967) J. Biol. Chem. 242, 265
- 181 - POLLET R., KNOLLE P. and WEISSMANN C. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 766
- 182 - PREISS J., DIECKMANN M. and BERG P. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1748
- 183 - RAPPAPORT I. (1965) Biochim. Biophys. Acta 103, 486
- 184 - RIVA S., FIETTA A.M., SILVESTRI L.G. and ROMERO E. (1972) Nature New Biology 235, 78
- 185 - ROBERTS J. and ARGETSINGER-STEITZ J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 1416
- 186 - ROBERTSON H., WEBSTER R. and ZINDER N.D. (1968) Nature 218, 533
- 187 - ROBERTSON H.D. and JEPPESEN P.G. (1972) J. Mol. Biol. 68, 417
- 188 - ROHRMANN G.F. and KRUEGER R.G. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 406
- 189 - ROSS J., AVIV H., SCOLNICK E. and LEDEP P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 264
- 190 - RUSSELL S.E. and IYER V.N. (1972) J. Bacteriol. 111, 7
- 191 - SALZER W., GESTELAND R. and BOLLE A (1967) Nature 215, 588
- 192 - SALZER W., FLUCK M. and EPSTEIN R.E. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 513
- 193 - SCHWARTZ J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 736
- 194 - SCOTT D.W. (1965) Virology 26, 85
- 195 - SEKIGUCHI M. and IIDA S. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 2315
- 196 - SHAPIRO B., SICCARDI A.-G., HIROTA Y. and JACOB F. (1970) J. Mol. Biol. 52, 75
- 197 - SHAPIRO L., FRANZE de FERNANDEZ M.T. and AUGUST T.J. (1968) Nature 220, 478
- 198 - SHIMURA Y., MOSES R.E. and NATHANS D. (1965) J. Mol. Biol. 12, 266
- 199 - SIGNER E. (1970) Virology 40, 624
- 200 - SILVERMAN P., MOBACH H. and VALENTINE R.C. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 412

- 201 - SILVERMAN P., ROSENTHAL S. and VALENTINE R. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 668
- 202 - SILVERMAN P. and VALENTINE R. (1969) J. Gen. Vir. 4, 111
- 203 - SIMON E.H. (1961) Virology 13, 105
- 204 - SINHA N., FUJIMURA R. and KAESBERG P. (1965) J. Mol. Biol. 11, 84
- 205 - SMYTH D.G., STEIN W.H. and MOORE S. (1963) J. Biol. Chem. 238, 227
- 206 - SOBELL H.M., JAIN S.C. and SAKORE T.D. (1971) Nature New Biology 231, 200
- 207 - SOBELL H.M. and JAIN S.C. (1972) J. Mol. Biol. 68, 21
- 208 - SPAHR P.F. and HOLLINGWORTH B. (1961) J. Biol. Chem. 236, 823
- 209 - SPAHR P.F. and GESTELAND R.F. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 876
- 210 - SPAHR P.F., FARRER M. and GESTELAND R.F. (1969) Nature 222, 455
- 211 - SPIEGELMAN S., HARUNA I., HOLLAND I.B., BEAUDREAU G. and MILLS D. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 919
- 212 - SPIEGELMAN S., BURNY A., DAS M.R., KEYDAR J., SCHLOM J., TRAVNICEK M. and WATSON K. (1970) Nature 227, 563.
- 213 - STALDER J. and ADELBERG E.A. (1972) J. Bactériol. 109, 447
- 214 - STAUDENBAUER W.L. and HOFSCHEIDER P.H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1634
- 215 - STAVIS R.L. and AUGUST J.T. (1970) Annual Review of Biochemistry 39, 527
- 216 - STRAUSS J., SINSHEIMER R. (1963) J. Mol. Biol. 7, 43-54
- 217 - SUGINO A., HIROSE S. and OKAZAKI R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1863
- 218 - SUGIYAMA T., HEBERT R. and HARTMAN K. (1967) J. Mol. Biol. 25, 455
- 219 - SUGIYAMA T. and NAKADA D. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1744
- 220 - SUGIYAMA T. and NAKADA D. (1968) J. Mol. Biol. 31, 431
- 221 - SUGIYAMA T. and STONE H.O. (1968) J. Mol. Biol. 36, 91
- 222 - SUGIYAMA T., STONE H.O. and NAKADA D. (1969) J. Mol. Biol. 42, 97
- 223 - SUGIYAMA T. and NAKADA D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 349
- 224 - TAKANAMI M., YAN Y. and JUKES T. (1965) J. Mol. Biol. 12, 761
- 225 - TEMIN H.M. and MIZUTANIS (1970) Nature 226, 1211
- 226 - TRAVERS A.A. and BURGESS R.R. (1969) Nature 222, 537
- 227 - TRAVERS A.A., KAMEN R.I. and SCHLEIF R.F. (1970) Nature 228, 748
- 228 - VALENTINE R.C., WARD R., STRAND M. (1969) Advan. Virus Res. 15, 1-59
- 229 - VASQUEZ C., GRANBOULAN N. and FRANKLIN R.M. (1966) J. Bacteriol. 92, 1779

- 230 - VINUELA E., ALGRANATI I.D. and OCHOA S. (1967) *European J. Biochem.* 1, 1
- 231 - VINUELA E., ALGRANATI I., FEIX G., GARWES D., WEISSMANN C. and OCHOA S. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 155, 558
- 232 - WARD R., SHIVE K. and VALENTINE R. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 8
- 233 - WARD R., STRAND M. and VALENTINE R. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 310
- 234 - WARD R. (1968) *Fed. Proc.* 27, 645
- 235 - WARD R., KONINGS R.N.H. and HOFSCHEIDER P.H. (1970) *Eur. J. Biochem.* 17, 106
- 236 - WATANABE M. and AUGUST T. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 21
- 237 - WEBER K. (1967) *Biochemistry* 6, 3144
- 238 - WEBER K. and KONIGSBERG W. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3563
- 239 - WEBER K. and OSBORN M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406
- 240 - WEBER H., BILLETER M.A., KAHANE S., WEISSMANN C., HINDLEY J. and PORTER C. (1972) *Nature New Biology* 237, 166
- 241 - WEHRLI W., KNUSEL F., SCHMID K. and STAEHLIN M. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 61, 667
- 242 - WEISSMANN C., SIMON L. and OCHOA S. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49, 407
- 243 - WEISSMANN C., SIMON L., BORST P. and OCHOA S. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 99
- 244 - WEISSMANN C., BORST P., BURDON R.H., BILLETER M.A. and OCHOA S. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51, 890
- 245 - WEISSMANN C. and OCHOA S. (1967) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 6, 353
- 246 - WEISSMANN C., FELIX G. and SLOR H. (1968) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 83
- 247 - WEISSMANN
- 248 - WICKNER S., HURWITZ J., NATH K. and YARBROUGH L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 619
- 249 - WICKNER W., BRUTLAG D., SCHEKMAN R. and KORNBERG A. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 965
- 250 - WITTMANN H.G. and WITTMANN-LIEBOLD B. (1966) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 163
- 251 - YAMAGATA H. and UCHIDA H. (1972) *J. Mol. Biol.* 63, 281
- 252 - ZAVADA V., FIKOTOVA J., KOUTECKA E., NEUBAUER Z. and RASKOVA M. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 480
- 253 - ZINDER N.D., VALENTINE R.C., ROGER M. and STOECKENIUS W. (1963) *Virology* 20, 638
- 254 - ZINDER N.D. (1965) *Annual Review of Microbiology* 19, 455

